

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Monika Mastiláková

Akumulace a lokalizace sekundárních metabolitů s ochrannou funkcí u obilnin pod vlivem zvýšené koncentrace CO₂ a vybraných stresových faktorů klimatické změny.

Accumulation and localization of secondary metabolites with protective function in grain crops growing under elevated CO₂ concentration and selected stress factors of climate change.

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 20.8.2017

Podpis:

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce prof. RNDr. Janě Albrechtové, Ph.D. za podnětná vyjádření, ochotu a trpělivost. Dále pak své konzultantce Mgr. Zuzaně Lhotákové, Ph.D. za cenné rady a optimismus. Velký dík patří mé rodině a všem blízkým za jejich podporu a povzbuzení.

Bakalářská práce vznikla s podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, projekt NPU LO1417.

Abstrakt:

Probíhající klimatická změna řadou faktorů prostředí vystavuje rostliny stále stresovějším podmínkám. Stresová reakce rostlin může způsobit snížení výnosu obilovin, které tvoří velkou část základních potravin, čímž se může prohlubovat ohrožení potravinové bezpečnosti lidstva. Pro budoucí uživení lidské populace je proto důležité pěstovat rostliny odolné vůči stresu. Schopnost vypěstovat odolné rostliny, vyžaduje porozumění jejich obranným mechanismům. Nespecifické indikátory stresu s ochrannou funkcí, například fenolické látky (FL), pomáhají určit stresovou odezvu rostlin.

Cílem práce je shrnout poznatky o působení stresových faktorů klimatické změny na akumulaci a lokalizaci sekundárních metabolitů, s ochrannou funkcí u obilovin, především ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.). Dále pak shrnout dostupné informace o metodách používaných pro detekci a lokalizaci sekundárních metabolitů v pletivech listu.

Pro detailní detekci a určení obsahu FL můžeme použít metody chromatografické, HPLC. Na přesnější lokalizaci FL v pletivech a buňkách je třeba využít histochemické detekce. Jednou z nejčastěji používaných metod je Neuova reakce využívající fluorescenční mikroskopii. Kombinace Neuovy reakce s moderními zobrazovacími a analytickými metodami, umožňuje velmi přesné určení a lokalizaci fenolických látek ve vzorku. Porozumění lokalizaci a akumulaci fenolických látek nám může pomoci určit vhodné, dostatečně odolné, genotypy rostlin.

Klíčová slova: zvýšená koncentrace CO₂, klimatická změna, ječmen setý, sekundární metabolity, nespecifické indikátory stresu, fenolické látky, fluorescenční mikroskopie, HPLC, histochemická detekce, Neuova reakce.

Abstract:

An ongoing climate change exposes plants to a whole range of environmental factors contributing to ever-increasing stressful conditions. The stress response of plants can reduce the yield of cereals, which make up a large part of food, thus increasing a threat to food security. It is therefore important to cultivate stress-resistant plants to ensure food security. The ability to cultivate resistant plants requires to understand their defensive mechanisms. Non-specific stress indicators with a protective function, such as phenolic compounds (FLs), help to determine the stress response of plants.

The aim of the present review is to summarize the knowledge about the effects of stress factors imposed by climate change on the accumulation and localization of secondary metabolites, with protective function in cereals, especially in barley (*Hordeum vulgare* L.). Further, to summarize the available information about the methods, which are used to detect and localize secondary metabolites in leaf tissues.

For detailed detection and determination of FLs' content we can use chromatographic methods, e.g. HPLC. More accurate localization of FLs in tissues and cells requires the use of histochemical detections. One of the most commonly used methods is the method of Neu's reaction using fluorescence microscopy. The combination of the Neu's reaction with modern imaging and analytical methods allows very precise determination and localization of phenolic compounds in a plant sample. Understanding to the localization and accumulation of phenolic compounds can help us to determine appropriate, enough resistant genotypes of plants.

Key words: increased CO₂ concentration, climate change, barley, secondary metabolites, nonspecific stress indicators, phenolic compounds, fluorescence microscopy, HPLC, histochemical detection, Neu's reaction.

Seznam použitých zkratek

AsA – kyselina askorbová

APX – askorbátperoxidáza

CGAss – estery kyseliny kávové a chinové

[CO₂] – koncentrace CO₂

GPX – guajakolperoxidáza

GR – glutationreduktáza

GSH – redukovaný glutation

HCA – deriváty kyseliny hydroxyskořicové

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)

HPTLC – vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (highperformance thin-layer chromatography)

IPCC – Mezivládní panel pro změnu klimatu (The Intergovernmental Panel on Climate Change)

LSCM = laserová řádkovací konfokální mikroskopie (Laser scanning confocal microscopy = CLSM
(confocal laser scanning microscopy))

NA – činidlo pro specifickou detekci flavonů (Naturstoffreagenz A; Neuovo činidlo; diphenyl-boric acid
2-aminoethyl ester; NPR = Natural Product Reagent A, 2-aminoethyl diphenylborinate)

NPP – čistá primární produkce (net primary production)

PAR – fotosynteticky aktivní záření (photosynthetically active radiation)

ppm – miliontina, jednotka koncentrace; („parts per milion“; 10⁻⁶)

RNS – volné dusíkaté radikály (reactive nitrogen species)

ROS – volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)

UV – ultrafialové (ultraviolet) záření

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 8 |
| 2 | Změna klimatu | 9 |
| 3 | Koncentrace CO ₂ a rostliny | 10 |
| 3.1 | Rostliny pod vlivem zvýšené koncentrace CO ₂ | 12 |
| 3.2 | Interakce CO ₂ s ostatními faktory prostředí | 12 |
| 4 | Sekundární metabolity | 13 |
| 4.1 | Flavonoidy..... | 15 |
| 5 | Reakce obilnin a akumulace vybraných sekundárních metabolitů pod vlivem zvýšené koncentrace CO ₂ a jiných stresových faktorů | 15 |
| 5.1 | Samotné zvýšení koncentrace CO ₂ | 16 |
| 5.2 | Kombinace CO ₂ s jiným stresovým faktorem | 17 |
| 5.2.1 | CO ₂ + zvýšená teplota | 17 |
| 5.2.2 | CO ₂ + sucho | 18 |
| 5.2.3 | CO ₂ + zasolení..... | 19 |
| 5.2.4 | CO ₂ + dostupnost dusíku..... | 19 |
| 5.3 | Sucho + teplo | 22 |
| 5.4 | UV | 22 |
| 6 | Mikroskopické metody pro detekci a lokalizaci vybraných sekundárních metabolitů v pletivech listu. | 23 |
| 6.1 | Tradiční histochemické metody..... | 24 |
| 6.2 | Fluorescenční metody..... | 24 |
| 6.2.1 | Principy fluorescenčních metod | 24 |
| 6.2.2 | Lokalizace vybraných sekundárních metabolitů pomocí Neuovy reakce | 25 |
| 6.2.3 | Lokalizace vybraných sekundárních metabolitů pomocí Neuovy reakce v kombinaci s HPLC určením těchto látek | 27 |
| 6.2.4 | Lokalizace vybraných sekundárních metabolitů pomocí kombinace Neuova činidla a jiných zobrazovacích a analytických metod | 31 |
| 6.2.5 | Závěry o výzkumu lokalizace vybraných sekundárních metabolitů pomocí fluorescenčních metod | 34 |
| | Závěr..... | 35 |
| | Seznam zdrojů a použité literatury..... | 37 |

1 Úvod

Rostliny získávají uhlík z atmosférického oxidu uhličitého, který je substrátem pro fotosyntézu, a zabudovávají ho do biomasy a dalších organických sloučenin. Zhruba od průmyslové revoluce od poloviny 19. století dochází v zemské atmosféře ke zvyšování koncentrace oxidu uhličitého a dalších skleníkových plynů. Lidé ke zvyšování množství skleníkových plynů přispívají především spalováním fosilních paliv a změnou využívání půdy. Zvýšené koncentrace skleníkových plynů velkou měrou přispívají ke klimatické změně. K projevům klimatické změny patří stále častější vysoké teploty a vlny veder, které rychle střídají přívalové srážky, bleskové povodně apod.

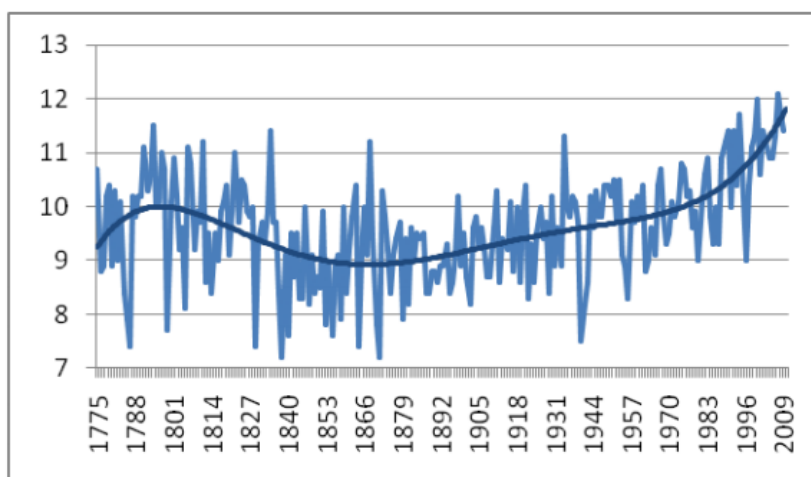
Klimatická změna může na rostliny působit stresově a způsobuje, že rostliny rostou v suboptimálních podmínkách růstu, které mohou vést ke snížení výnosů, poškození rostlin, až k jejich odumření. Tyto negativní změny se týkají i hospodářských plodin, které jsou důležité pro uživení lidstva, mezi které patří především obiloviny. Zvýšená teplota např. zkracuje životní cyklus rostlin, urychluje dekompozici a snižuje čistou primární produkci rostlin (net primary production = NPP) (IPCC, 2014a, 2014b). V důsledku zvýšených teplot a vln veder došlo v první dekádě 21. století ke snížení celkové světové NPP v porovnání s lety 1982-1999, kdy světová terestrická NPP vzrůstala (Zhao and Running, 2010).

Mezivládní panel pro změnu klimatu (IPCC, 2014c) varuje, že pokud hospodářsky využívané obiloviny (pšenice, rýže, kukuřice, ječmen) mírných a tropických oblastí nebudou adaptovány na vyšší teploty, tak dojde při teplotě o 2°C vyšší než byla na konci 20. století, k významnému poklesu jejich výnosu. Je vysoce pravděpodobné, že se vzrůstající lidskou populací a poptávkou po potravinách, by pokles výtěžnosti u hlavních světových plodin, znamenal vysoké riziko pro potravinovou bezpečnost po celém světě. Do roku 2100 může kombinace vysokých teplot a nedostatku vody ohrozit pěstování potravin po celém světě. Z tohoto důvodu IPCC doporučuje vyvinout nové kultivary zemědělských rostlin, které budou adaptované na změny teplot, sucha a zvyšující se koncentraci CO₂ a případně další stresové faktory související s klimatickou změnou. Pokud chceme vypěstovat rostliny odolné vůči klimatickým změnám, je nesmírně důležité nejdříve porozumět procesům, které v rostlinách při stresu probíhají. Rostliny v reakci na stres mj. odpovídají nesespecifickými indikátory stresu, například hromaděním fenolických látek. O fenolických látkách je známo, že chrání rostliny před herbivory a patogeny, UV zářením a jsou to látky s antioxidační aktivitou, které je chrání před následky stresu.

V úvodní části práce je nejprve představeno obecné téma uvádějící do problematiky, tj. probíhající změna klimatu. Dále jsou uvedeny reakce rostlin na zvýšenou koncentraci CO_2 v kombinaci se stresovými faktory, způsobenými klimatickou změnou, se zaměřením na akumulaci fenolických látek v pletivech listu, především pak u obilovin a z nich u ječmene – druhé nejpestovanější plodiny v Evropské Unii (Eurostat [online]) a čtvrté světově nejpestovanější obilniny (FAO [online]). Z obilovin je více pozornosti věnováno ječmeni, z důvodu, že bych se ráda ve své diplomové práci věnovala právě výzkumu ječmene. V poslední části práce jsou shrnuty poznatky o mikroskopických metodách pro detekci a lokalizaci vybraných sekundárních metabolitů v pletivech listu ječmene. V důsledku malého množství literatury věnovaného detekci sekundárních metabolitů v listech ječmene jsou metody detekce a lokalizace sekundárních metabolitů popsány i na jiných druzích rostlin.

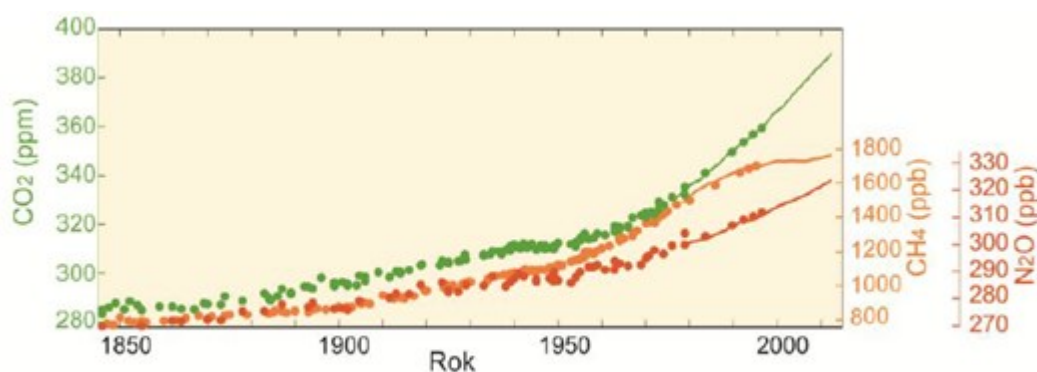
2 Změna klimatu

Klima je charakteristický dlouhodobý stav počasí v určité oblasti, podmíněný energetickou bilancí, cirkulací atmosféry, charakterem aktivního povrchu a dnes i člověkem. Stav klimatu ovlivňují mj. skleníkové plyny v atmosféře, které pohlcují dlouhovlnné infračervené záření v atmosféře a vyzařují ho všemi směry, včetně směru k povrchu Země. Pokud se množství skleníkových plynů v atmosféře zvyšuje, dochází k nárůstu množství infračerveného záření ve formě tepla, které je vráceno na povrch Země. Z mnoha dostupných grafů lze vyčíst, že teplota v posledních desítkách let roste. Příkladem může být graf z pražského Klementina (Obrázek 1).



Obrázek 1: Průměrná roční teplota v Klementinu v období 1775 – 2010. Převzato a upraveno dle: (ČHMÚ [online])

Přirozené toky uhlíku jsou v globálním systému Země víceméně v rovnováze, činnost člověka však tuto rovnováhu v toku uhlíku v posledních stoletích narušuje. Od průmyslové revoluce roste množství uvolňovaného oxidu uhličitého i dalších skleníkových plynů, především metanu a oxidu dusného (Obrázek 2). Důvodem nárůstu množství skleníkových plynů v atmosféře je především ekonomický a populační růst (IPCC, 2014c). Největší podíl na antropogenních emisích CO_2 má spalování fosilních paliv, dále pak změny ve využívání půdy jako je odlesňování či urbanizace, ale i výroba cementu. Fosilní paliva představují bývalý atmosférický uhlík, který do nich byl v dávné minulosti uložen během procesu fotosyntézy. Problémem je rychlost uvolňování tohoto uhlíku, zatímco ukládání uhlíku ve formě uhlí či ropy trvalo miliony let, jeho těžba a spalování je nyní mnohonásobně rychlejší, pouze v řádu stovek let (Metelka and Tolasz, 2009).



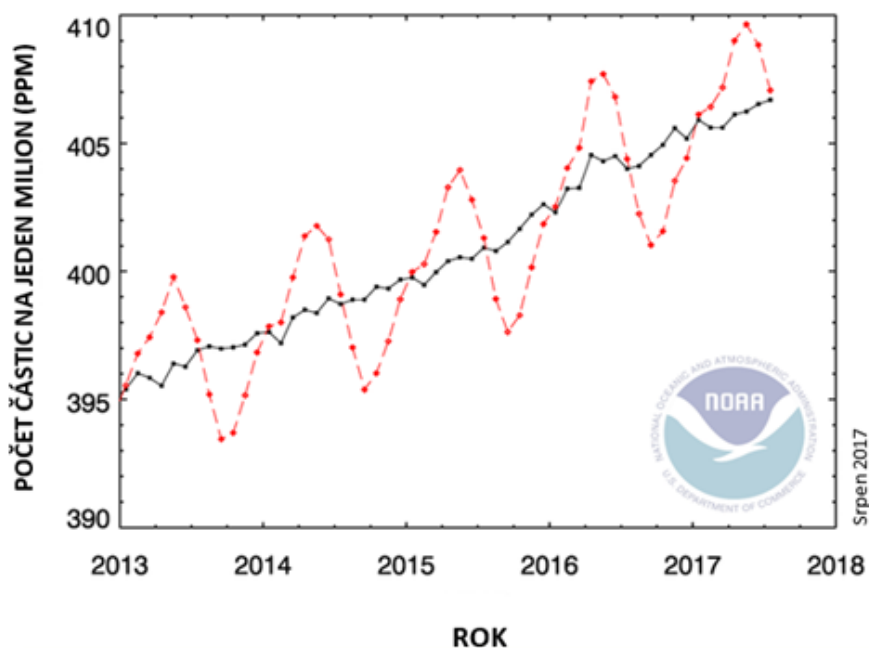
Obrázek 2: Globální průměrné atmosférické koncentrace skleníkových plynů, oxidu uhličitého (CO_2 , zelená), metanu (CH_4 , oranžová) a oxidu dusného (N_2O , červená) stanovené z vrtných jader v ledu (tečky) a z přímých atmosférických měření (čáry). Převzato z: (IPCC, 2014c).

3 Koncentrace CO_2 a rostliny

Rostliny pohlcují atmosférický oxid uhličitý a zabudovávají ho v procesu fotosyntézy do organických sloučenin. Během vývoje Země se množství CO_2 v atmosféře měnilo. S příchodem fotosyntetizujících organismů zhruba před 3 mld let začínalo množství CO_2 pomalu klesat. S příchodem oxygenní fotosyntézy, přibližně před 2,5 mld let se do atmosféry Země začal dostávat kyslík a s tím, jak rostla biomasa fotosyntetizujících rostlin jeho koncentrace stoupala, zároveň klesala koncentrace CO_2 (dále $[\text{CO}_2]$). Dnešní koncentrace kyslíku je přibližně 21 % a $[\text{CO}_2]$ přibližně 0,04 % (400 ppm).

V uplynulých 400 000 letech docházelo ke kolísání $[\text{CO}_2]$ (Petit et al., 1999). Tato kolísání odpovídala přechodu dob ledových a meziledových. V dobách ledových byla $[\text{CO}_2]$ zhruba 180-200 ppm a v dobách meziledových kolem 280-300 ppm. Z analýz ledových vrtů víme, že alespoň v uplynulých 400 000 letech se nikdy nevyskytly dnešní hodnoty $[\text{CO}_2]$ pohybující se kolem 400 ppm. Dnes už víme, že tento závěr můžeme dokonce vztáhnout k uplynulým 800 tisícům let, kdy $[\text{CO}_2]$ nepřesáhla 300 ppm (Lüthi et al., 2008). Až do průmyslové revoluce obsahovala atmosféra přibližně stálou hodnotu $[\text{CO}_2]$ kolem 280 ppm.

V období od průmyslové revoluce do dnes, tedy zhruba posledních 200 let, došlo k výraznému nárůstu uvolňování C do atmosféry díky činnosti člověka a tím k nárůstu atmosférické $[\text{CO}_2]$ a dalších skleníkových plynů. V současné době je do atmosféry ročně uvolňováno antropogenně více než 9 Gt uhlíku ročně (IPCC, 2013). Dnešní koncentrace oxidu uhličitého už přesáhla 400 ppm a dokonce ani během roční oscilace už neklesá pod tuto hranici (Obrázek 3).



Obrázek 3: Průměrná globální měsíční koncentrace CO_2 v zemské atmosféře měřená na nejstarší CO_2 monitorovací stanici na Mauna Loa na Havaii. Záznam měření z let 2013-2017, srpen. Červená přerušovaná čára značí aktuální měsíční průměrné hodnoty, tj. roční výchylky v koncentraci vzhledem k trendu, který je prezentován černou čarou, kde jsou data korigována na průměrný roční cyklus. K výchylkám dochází v důsledku střídání ročních období. V období zimních měsíců koncentrace CO_2 globálně stoupá, protože především klesá jeho spotřeba fotosyntézou terestrické vegetace a uvolňování ze zamrzlé půdy severní polokoule. Převzato a upraveno dle: (ESRL [online]).

3.1 Rostliny pod vlivem zvýšené koncentrace CO₂

V poslední době je nárůst koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře velmi rychlý, dochází k mnohočetným projevům klimatické změny přinášejícím stresové faktory pro rostliny a bude záležet, zda se rostliny zvládnou i přes tak vysoké tempo změn přizpůsobit. Zvýšená [CO₂] ovlivňuje mnoho fyziologických procesů rostlin, které se ovlivňují i navzájem. Přímé vlivy zvýšené [CO₂] (např. zvýšení rychlosti fotosyntézy, snížení rychlosti fotorespirace, snížení vodivosti průduchů či změna v účinnosti využití vody) ovlivňují fyziologické procesy skrze vlivy nepřímé. Mezi nepřímé vlivy patří například zvýšená tvorba asimilátů v důsledku zvýšené rychlosti fotosyntézy či zvýšení relativního poměru C/N, což má následně vliv na změnu kvality biomasy a zvýšení její palatability pro herbivory (Bezemer and Jones, 1998). Výše popsané reakce jsou běžné pro C3 rostliny, reakce rostlin C3 je tu popsána podrobněji, jelikož se tato práce zabývá především C3 obilninami, převážně pak ječmenem. C4 obilnina, kukuřice, v tomto přehledu převážně není probírána.

Ačkoliv jsou u rostlin známa evoluční přizpůsobení (ztráta, zisk nebo modifikace genů) na různé podmínky podmiňující evoluční adaptace, není zřejmé, zda se rostliny dokáží geneticky přizpůsobit ve velmi málo generacích. Například Teng et al., (2009) uvádějí, že možná nikdy nedojde k přizpůsobení rostlin ke zvýšené [CO₂] pouze v průběhu několika generací. V jejich experimentu s 15 generacemi huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) se neprojeví žádné změny v následujících generacích pod zvýšenou [CO₂]. Při polemice nad příčinou nepřizpůsobení se *A. thaliana* vysokým koncentracím docházejí k závěru, že jedním z důvodů může být malý potenciál genetické variability v odpovědích na zvýšenou [CO₂]. Otázkou zůstává, zda by tato případná malá variabilita platila pro všechny druhy rostlin či jen pro některé, což by mohlo mít dopady na zemědělskou výrobu.

3.2 Interakce CO₂ s ostatními faktory prostředí

Klimatickou změnu, kterou jako jeden z hlavních příčinných faktorů doprovází zvýšení koncentrace oxidu uhličitého, však má i další doprovodné projevy. Lze očekávat různé projevy klimatické změny na abiotických podmínkách prostředí např. teplotě, dostupnosti vody, kvalitě půdy apod.

Často zmiňovaným projevem změny klimatu je vysoká teplota a zvyšující se výskyt vln veder. IPCC varuje před budoucími vlnami veder a stoupajícím počtem teplých dnů a nocí ve velké části světa. Předpokládá se, že ve srovnání s průměry z let 1850 – 1900 překročí změna

globálních povrchových teplot do konce 21. st. (2081-2100) 2°C. Mnoho studií prokazuje, že negativních dopadů změn klimatu, na výnosy hospodářských rostlin je mnohem více, než těch pozitivních, právě z důvodu interakce různých projevů klimatické změny, především pak zvýšené teploty a sucha (IPCC, 2014b). To, že nyní je již zřetelný negativní dopad změn klimatu, zaznamenali ve své studii i Zhao and Running, (2010) na výsledcích čisté primární produkce, které jsou zmíněny výše. Lidská populace narůstá a navyšuje se poptávka po potravinách, a proto je nutné zajistit potravinovou bezpečnost, což může být v budoucnosti velký problém. Na nedostatek potravin a jejich sníženou kvalitu je nutné reagovat vytvářením nových odrůd plodin, odolných ke změnám abiotických faktorů prostředí (koncentrace oxidu uhličitého, teplota, sucho, aj.). Zde přicházejí na řadu obory experimentální biologie, genetiky a šlechtění rostlin, které se tímto zabývají.

V další kapitole se zaměřím na nespecifické indikátory stresu, konkrétně na sekundární metabolity u rostlin, které se používají k detekci odpovědi rostlin na stresové faktory prostředí.

4 Sekundární metabolity

Fyziologický stav rostlin závisí na faktorech prostředí a jejich vzájemném působení. Pokud se rostliny vlivem podmínek prostředí dostanou mimo růstové optimum, dostanou se do stresu, se kterým se musí následně vyrovnat. Průběh stresové odpovědi závisí na délce a intenzitě působení stresoru, fyziologickém stavu rostliny a mj. na genové vybavenosti rostliny, která určuje nakolik odolná rostlina je. Symptomy poškození jsou určovány pomocí indikátorů poškození rostlin. Indikátory jsou kvantitativní či kvalitativní údaje o vlastnosti, procesu či odpovědi rostlin na poškození. Indikátory mohou být povahy molekulární (kondenzace chromatinu), biochemické (např. akumulace reaktivních forem kyslíku (ROS = anglicky reactive oxygen species), fyziologické (rychlost fotosyntézy, vodivost průduchů aj.), mikroskopické (strukturální změny) nebo makroskopické (např. chloróza listu viditelná pouhým okem). Většina indikátorů obvykle reaguje na soubor vícero faktorů a není vždy s jistotou možné určit konkrétní příčinu, z tohoto důvodu takové indikátory nazýváme nespecifické indikátory fyziologického stavu rostlin (Albrechtová et al., 2017).

Sekundární metabolity (dále SM) jsou látky, které nejsou produktem primárního metabolismu, ale vycházejí z něho, nepatří k základní molekulární výbavě rostlinné buňky, mohou se nacházet jen v určitých orgánech, v určitém vývojovém stádiu, za určitých podmínek prostředí nebo se také nachází jen v určitém rostlinném druhu. SM plní mnoho různorodých funkcí, dodávají rostlině pevnost, jiné ji ochraňují před dopadajícím zářením, patogeny nebo

škůdci, další se mohou podílet na příjmu a přenosu signálů mezi rostlinou a prostředím i uvnitř rostliny či mohou lákat opylovače (Buchanan et al., 2000 - kapitola 24). Interakce CO₂ s dalšími abiotickými environmentálními faktory, jako je teplota, herbivoři či dostupnost zdrojů (např. světla, živin) může změnit účinky CO₂ na SM (Iason et al., 2012 - kapitola 7). Zvýšená pozornost bude dále v této práci věnována fenolickým látkám, které zahrnují řadu sekundárních metabolitů sloužících jako nespecifické indikátory stresu.

Sekundární metabolity jsou podle své chemické povahy rozděleny do tří základních skupin: izoprenoidy (terpenoidy), látky obsahující dusík (alkaloidy) a fenolické látky. Biosynteticky se odvozují od produktů fotosyntézy a meziproductů respiračního metabolismu. Mezi izoprenoidy patří například některé éterické oleje, kaučuk či karotenoidy. Funkcí alkaloidů (např. kyanogenní glykosidy) je ochrana rostliny před býložravci. Fenolické látky jsou hlavní skupinou sekundárních metabolitů, kterou se v mé práci budu zabývat.

Dnes je známo asi 8000 různých fenolických látek. Jsou strukturně odvozeny od fenolu (C₆H₅OH), tvořeny jsou základními fenylypropanovými jednotkami, jejichž biosyntéza vychází většinou z fenylyalaninu a tyrozinu, které vznikly reakcemi šikimátové metabolické dráhy (Heldt and Heldt, 2005; Shahidi and Naczki, 2003).

Fenolické látky plní mnoho funkcí, například strukturní a ochrannou funkci v buněčných stěnách (suberin, lignin), ochrannou funkci před UV zářením (flavony a flavonoly), fungují jako atraktanty pro opylovače (cyanidin, pelargonidin) a jako signální faktor při interakci rostlin se symbionty, např. mykorhizními houbami (flavony a flavonoly).

Fenolické látky můžeme rozdělit do čtyř skupin: jednoduché fenoly, kyseliny fenolkarboxylové, fenylypropanoidy a flavonoidy.

Jednoduché fenoly se uplatňují při tmavnutí listů. Kyseliny fenolkarboxylové jsou rozšířeny zejména jako polymery kyseliny galové, tj. třísloviny (taniny). Základními fenylypropanoidy jsou kyselina skořicová a její deriváty. Charakter fenylypropanoidu má také lignin, jenž impregnuje buněčné stěny a tvoří 20-40 % dřevní hmoty vyšších rostlin, čímž se po celulóze stává nejdůležitější stavební látkou rostlin.

Nejrozsáhlejší skupinou fenolických látek jsou flavonoidy. V této práci jim bude věnována zvláštní pozornost vzhledem k tomu, že právě v této skupině je řada nespecifických indikátorů stresu, neboť dochází k jejich hromadění často v rozpustné podobě či dochází k impregnaci buněčných stěn, a proto jsou podrobeny častému zkoumání jejich detekce a lokalizace, jak bude probráno v závěrečné části práce.

4.1 Flavonoidy

Flavonoidy obsahují různorodou skupinu více než 4500 sloučenin. Jejich základ tvoří molekula flavanu. Flavonoidy zvyšují toleranci k abiotickým stresům, jsou známé pro svou antioxidační aktivitu a akumulují se v odpovědi na stres (Andersen and Markham, 2006). Pravděpodobně slouží spíše k redukci oxidativního poškození, které již vzniklo, tj. k jejich antioxidační funkci, než k tomu, aby chránily před jeho vznikem (Agati and Tattini, 2010).

Je již dlouho známo, že se flavonoidy hromadí hlavně v epidermálních buňkách a povrchových orgánech rostlin. Nicméně výzkum pokročil a lokalizace flavonoidů byla prokázána i v jiných částech rostlinných pletiv (Agati et al., 2009), jak bude pojednáno v kapitole 6.

Rozdělení flavonoidů může být různé, jednou z možných variant je klasifikace do následujících šesti skupin: flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, anthokyanidiny, flavanoly (Ramešová and Sokolová, 2014). Pro tuto práci budou nejdůležitějšími skupinami antokyany, flavony a flavonoly.

Významnými sloučeninami flavonů jsou apigenin a luteolin. Luteolin je zodpovědný za žlutou barvu rostlin. Mezi nejčastější sloučeniny flavanolů v rostlinách patří kvercetin, kaempferol, myricetin a rutin, které mají výraznou antioxidační aktivitu. Flavon a flavonoly mohou sloužit jako chemické nebo UV signály k přilákání nebo odrazení hmyzu, a jsou to vysoce účinné UV filtry. Antokyany jsou známé jako rostlinné pigmenty hlavně květů a plodů rostlin, které je barví do odstínů červené, modré a fialové barvy. Nejběžnějšími antokyany jsou pelargonidin, cyanidin, delphinidin a petunidin. Vlastností antokyanů je ochrana chloroplastů před poškozením silným zářením (Andersen and Markham, 2006).

5 Reakce obilnin a akumulace vybraných sekundárních metabolitů pod vlivem zvýšené koncentrace CO₂ a jiných stresových faktorů

V souvislosti s probíhající klimatickou změnou dochází ke změnám abiotických podmínek prostředí, kdy rostliny na suboptimální podmínky růstu reagují nesespecifickými indikátory stresu, např. ukládáním sekundárních metabolitů. Zdá se, že zvýšená [CO₂] odlišně ovlivňuje jednotlivé specifické typy sekundárních metabolitů (Iason et al., 2012).

V této části práce jsem se zaměřila především na kombinaci zvýšené [CO₂] s jiným faktorem. Zvýšená [CO₂] je jedním z hlavních faktorů, který provází klimatickou změnu jako

příčinný faktor, kterému se věnuje tato práce. Vzhledem k malému množství literatury věnujícímu se reakci obilovin a akumulaci sekundárních metabolitů v nich, jsou následující podkapitoly pojaty pomocí představení několika málo studií, věnujících se tomuto tématu. Nejprve se zaměřím na studie, které se zabývaly působením zvýšené $[\text{CO}_2]$, ať již samostatně či v kombinaci s jiným stresovým faktorem. Dále pak budou probrány další samostatné stresové faktory působící na obilniny v rámci klimatické změny.

5.1 Samotné zvýšení koncentrace CO_2

Oxid uhličitý je jedním z tzv. skleníkových plynů. Skleníkové plyny ovlivňují, skleníkovým efektem, teplotu planety. S oteplováním planety přibývají období zvýšených teplot a s tím související sucha. Sucho a vysoké teploty jsou pro rostliny stresové faktory a negativně ovlivňují nejen jejich fotosyntézu, ale i celou řadu fyziologických procesů. Při vyšší $[\text{CO}_2]$ dochází k tzv. přivírání průduchů, které rostlinám umožňuje snížit výdej vody evapotranspirací, čímž se rostliny brání proti úplnému vysušení. Proto je třeba zkoumat odolnost rostlin na stresové podmínky, které souvisejí s klimatickou změnou. Důležité je to především u hospodářsky využívaných rostlin, na kterých je závislá výživa lidstva, především hlavních obilovin: kukuřice, pšenice, rýže a ječmen.

Účinky samotné zvýšené $[\text{CO}_2]$ na rostliny jsou popisovány stručněji než v kombinaci například se zvýšenou teplotou. Ačkoliv je možné v experimentu vystavit rostliny jen zvýšené $[\text{CO}_2]$ a ostatní faktory zanechat nezměněné, v přírodě to tak neprobíhá. Tudíž je ve studiích více informací věnováno kombinaci zvýšené $[\text{CO}_2]$ a dalšího stresového faktoru, kupříkladu zvýšené teploty.

Výsledky z prací, které se zabývaly samostatně působící zvýšenou $[\text{CO}_2]$ u obilovin jsou srovnatelné. Pro příklad lze uvést reakce rostlin ječmene. Při samostatném působení zvýšené $[\text{CO}_2]$ (700ppm) došlo u ječmene ke zvýšení výnosu o 54 % (Alemayehu et al., 2014). Clausen et al., (2011) zjistili pro stejně vysokou $[\text{CO}_2]$ velmi podobnou hodnotu zvýšení výnosu (56 %) za neomezeného přístupu ječmene k vodě. V předchozím experimentu (Alemayehu et al., 2014) byl přísun vody regulován. Z výše zmíněných výsledků vyplývá, že dostupnost vody pravděpodobně nebude ovlivňovat výnos rostlin ječmene, pokud bude zvýšená $[\text{CO}_2]$ působit na rostliny samostatně, bez kombinace s jiným změněným faktorem prostředí, jako je např. zvýšená teplota.

Tendence k nárůstu výnosu pod zvýšenou $[\text{CO}_2]$ zaznamenali i Long et al., (2006) pro pšenici, která je opět rostlinou s krátkým životním cyklem. Ovšem u dřevin, které jsou vystaveny

působení CO₂ po celý svůj mnohaletý životní cyklus, může být působení zvýšené koncentrace ne tak přímočaré ve smyslu zvýšení rychlosti fotosyntézy, neboť obvykle dochází k aklimaci a rychlost fotosyntézy se vrátí do hodnot blízkých naměřeným bez působení zvýšené [CO₂] (Lhotáková et al., 2012; Urban, 2003). U obilovin nebyl proces fotosyntetické aklimace popsán, neboť během jednoho roku nedochází k tak výrazným změnám v [CO₂] jako v průběhu desítek let.

5.2 Kombinace CO₂ s jiným stresovým faktorem

Jak bylo popsáno výše, v přírodě působí abiotické podmínky na rostlinu v kombinaci nikoli jednotlivě. Abiotickými podmínkami se myslí například teplota, dostupnost vody, koncentrace oxidu uhličitého, dostupnost živin, koncentrace ozonu apod. V této kapitole jsou popsány účinky pozměněných abiotických podmínek na obiloviny. Abiotické podmínky byly ve studiích popsaných níže změněny tak, aby odpovídaly hodnotám, které jsou očekávány v budoucnosti v návaznosti na změny klimatu.

5.2.1 CO₂ + zvýšená teplota

V případě samostatného působení zvýšené teploty na rostliny se studie shodují na negativním působení tohoto stresoru. Zvýšená teplota snižuje výnosy, urychluje a zkracuje fáze vývoje rostlin a tím má dopad na množství zrna, které rostliny vyprodukují (Alemayehu et al., 2014; Barnabás et al., 2008; Clausen et al., 2011; Hakala et al., 2012; Rollins et al., 2013).

U zvýšené teploty, na rozdíl od zvýšené [CO₂], záleží na tom, zda má rostlina dostatečný přísun vody či nikoliv. Například Alemayehu et al., (2014) zjistili za samostatného působení zvýšené teploty, pokles ve výnosu rostlin ječmene o více než polovinu, 69 %, zatímco Clausen et al., (2011) zaznamenali pokles výnosu jen o necelou čtvrtinu, 27 %. Rozdíl ve výnosech rostlin ječmene za zvýšené teploty byl v dostupnosti vody. Zatímco v první studii byl přístup vody regulován (Alemayehu et al., 2014), v druhém případě byly rostliny vodou dostatečně zásobeny (Clausen et al., 2011).

Celkový výnos rostlin ječmene se změnil, oproti samostatnému působení zvýšené teploty, v případě, kdy bylo zvýšení teploty použito v kombinaci se zvýšenou [CO₂]. Při zvýšené teplotě + zvýšené [CO₂] byl zaznamenán pokles výnosu o 53 % při regulovaném přístupu vody (Alemayehu et al., 2014), zatímco při dostatečném zásobování vodou byl pokles výnosu zaznamenán pouze o 14 % (Clausen et al., 2011). Pokles výnosu rostlin ječmene při kombinaci

faktorů zvýšené teploty a zvýšené $[\text{CO}_2]$ oproti samostatnému působení zvýšené teploty byl zaznamenán i v jiné studii (Rollins et al., 2013).

Z těchto výsledků vyplývá, že kombinace faktorů prostředí (zvýšená teplota a zvýšená $[\text{CO}_2]$) má na výnos rostlin ječmene negativní dopad. Nicméně se zdá, že zvýšená $[\text{CO}_2]$ mírně kompenzuje ztráty způsobené zvýšenou teplotou.

Působení stresových podmínek prostředí může způsobit změny v odpovědi na biotické mechanismy, jako například v odpovědi na napadení patogenem. Mikkelsen et al., (2015) uvádí změny obranného mechanismu pro ječmen při zvýšené $[\text{CO}_2]$. Rostliny ječmene byly kultivovány v podmínkách zvýšené $[\text{CO}_2]$, teploty a ozonu jako samostatných faktorů i v jejich kombinaci a posléze byly infikovány padlím. Změny v obranném mechanismu rostlin ječmene byly zaznamenány na hydroxynitrilglukosidech. Hydroxynitrilglukosidy jsou známy svou schopností ochrany proti herbivorům a některým houbovým patogenům. V listech ječmene autoři identifikovali několik sekundárních metabolitů, kromě hydroxynitrilglukosidů, například flavonoidy. Z flavonoidů identifikovali například saponarin a lutanarin.

V první části pokusu bylo množství sekundárních metabolitů v listech ječmene měřeno jen v podmínkách zvýšené $[\text{CO}_2]$, v druhé části pokusu pak pod kombinací faktorů, zvýšené $[\text{CO}_2]$ a zvýšené teploty. Výsledky z této studie (Mikkelsen et al., 2015) jsou následující. Rostliny ječmene upravovaly množství sekundárních metabolitů v reakci na změny prostředí. Na naměřené hodnoty množství sekundárních metabolitů po 6 a 18 hodinách měl pravděpodobně vliv cirkadiánní rytmus rostliny. K poklesu infekce padlím, v porovnání s normálními podmínkami, došlo, pokud byly rostliny ječmene vystaveny samotné zvýšené $[\text{CO}_2]$ nebo samotné zvýšené teplotě. Ovšem pokud byly stresory aplikovány v kombinaci, zvýšená teplota + zvýšená $[\text{CO}_2]$, tak se efekt zvýšené obrany před patogenem přestal projevovat a rostliny byly náchylné stejně jako za normálních podmínek. Z toho vyplývá, že kombinace stresových faktorů zvýšené $[\text{CO}_2]$ a zvýšené teploty je pro rostliny ječmene nebezpečnější než samotné zvýšení teploty či samotné působení zvýšené $[\text{CO}_2]$.

5.2.2 CO_2 + sucho

Sucho velmi často doprovází zvýšené teploty a je důležitým abiotickým faktorem, který limituje růst rostlin. V dnešní době pěstované obilniny se zdají být dobře přizpůsobeny k nedostatku vody, jelikož se na tuto vlastnost již dříve pěstitelé zaměřovali. Rostliny řeší stresové podmínky zvýšené teploty jejich prostředí například snížením spotřeby vody a zároveň

s tím navyšují kapacitu pro její příjem. Snížení vodivosti průduchů v důsledku zvýšené teploty sníží výdej vody a zvětšení kořenového systému zvýší schopnost přijímat vodu a minerální živiny. Dále dochází za zvýšené teploty a sucha ke změně osmotického potenciálu rostliny. Osmotický potenciál se sníží v důsledku akumulace solutů a tím se sníží vodní potenciál rostliny (Wall et al., 2011).

5.2.3 CO₂ + zasolení

Sucho může být, především v zavlažovaných oblastech, doprovázeno zvýšenou koncentrací soli v substrátu. Stres ze zasolení snižuje rychlost čisté fotosyntézy, zatímco zvýšená [CO₂] má efekt přesně opačný. Pérez-López et al., (2012) nechali růst ječmen v podmínkách zvýšené salinity a zvýšené [CO₂] (samostatně i v kombinaci). Samostatné působení faktorů odpovídá výše uvedeným reakcím rostlin. Když bylo větší množství soli zkombinováno se zvýšenou [CO₂], pak došlo ke zvýšení rychlosti difúze CO₂ do listu, navzdory nižší vodivosti mezofylu pro CO₂ a nižší vodivosti průduchů. Zvýšení dostupnosti CO₂ v chloroplastu zvýšilo sink pro ATP a NADPH (sink elektronů). Zvýšení sinku zmírnilo limitaci v rychlosti fotosyntézy, která byla způsobená vyšším obsahem soli v půdě. Zvýšená [CO₂] tedy zmírnila účinky zasolení tím, že udržela příznivé podmínky v listech ječmene.

5.2.4 CO₂ + dostupnost dusíku

Dusík je pro rostliny jedním z hlavních esenciálních makroprvků. Při nedostatku dusíku se začíná tvořit více sloučenin na bázi uhlíku na úkor sloučenin na bázi dusíku. Fenolické sloučeniny jsou na uhlík bohaté metabolity, které reprezentují velkou skupinu sekundárních metabolitů. Nedostatek dusíku v rostlině je znát na jejích fyziologických procesech. Projevuje se například inhibicí růstu i vývoje rostliny a chlorózou především na starších listech a zvýšenou tvorbou antokyanů.

Obecně lze říci, že zvýšená [CO₂] způsobuje v rostlině úbytek koncentrace dusíku. Například pro pšenici Sinclair et al., (2000) zjistili, že zvýšená [CO₂] v kombinaci se suchem či bez něj, měly jen malý efekt na koncentraci N v listech pšenice. Nicméně Xu et al., (2013) v další studii na pšenici upozorňují, že mírné sucho může urychlit přesun N z listů do sinků (kořeny nebo zrna). Kromě toho, při kombinaci zvýšené [CO₂] se suchem, je omezena schopnost kořene absorbovat N.

Kovacik et al., (2014) pěstovali český kultivar ječmene Bojos za nedostatku dusíku 15 dní a zjišťovali, jak budou rostliny reagovat. Nedostatek dusíku u rostlin ječmene indukoval

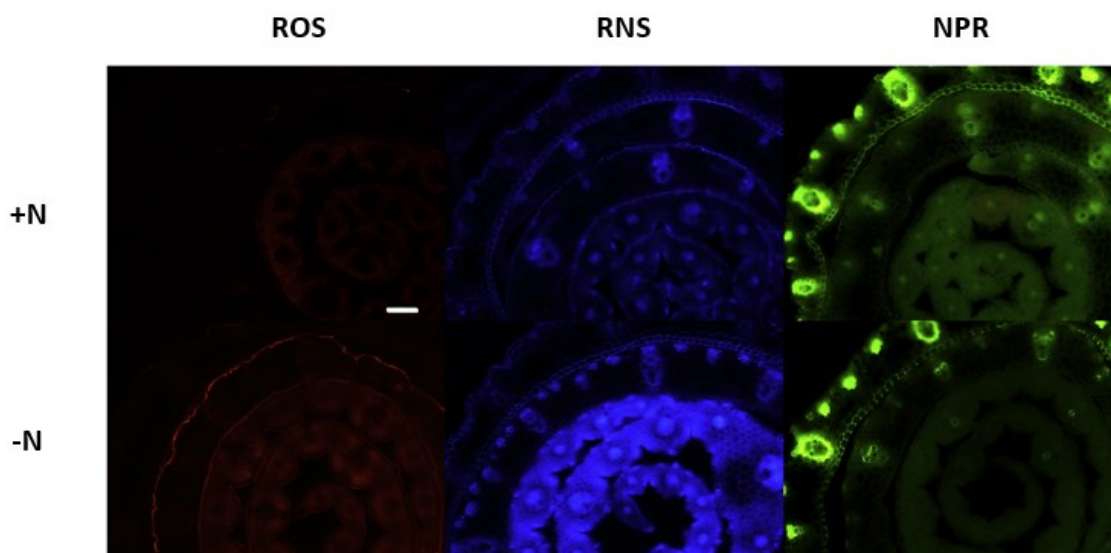
nárůst fenolických látek v nadzemní části. Dalším projevem nedostatku dusíku byl nárůst projevů oxidativního stresu. Při oxidativním stresu se v rostlině tvoří kyslíkové radikály (ROS = reactive oxygen species) a radikály dusíku (RNS = reactive nitrogen species). V kořenech nárůst množství antioxidantů udržuje homeostázu s ROS a RNS, aby byl zajištěn rozvoj kořenů.

Rostliny na stres často reagují nárůstem množství antioxidantů. Produkce ROS je kontrolována enzymatickými a neenzymatickými antioxidanty. (Kovacik et al., 2014) studovali u rostlin rostoucích při nedostatku dusíku konkrétně tyto enzymatické (askorbátperoxidáza (APX), guajakolperoxidáza (GPX), glutathionreduktáza (GR)) a neenzymatické (fenoly, glutathion (GSH = redukovaný glutathion), kyselina askorbová (AsA)) antioxidanty. Dle barevných fluorescenčních produktů je možné detekovat aktivity enzymů podílejících se na syntéze SM a navíc aktivitu lokalizovat do určitých pletiv, buněk či buněčných struktur.

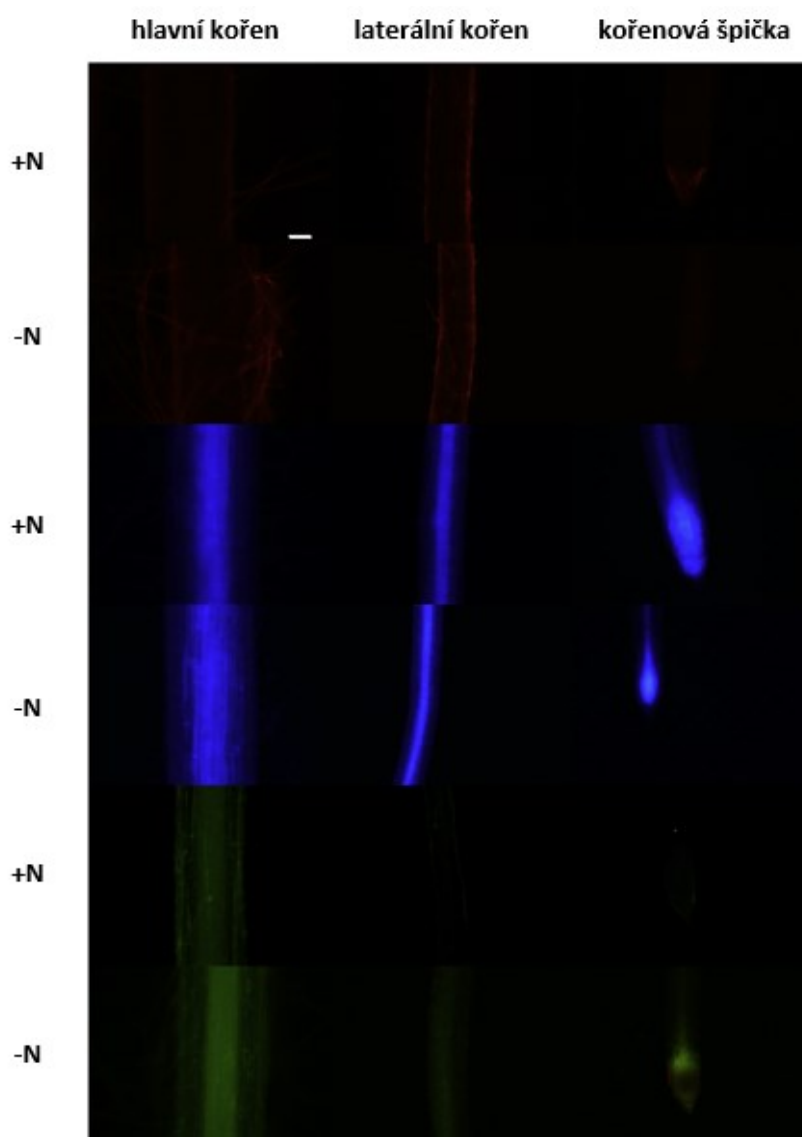
Množství antioxidantů (glutathion a kyselina askorbová) v nadzemní části při nedostatku dusíku poklesl, zatímco v podzemní části vzrostl nebo zůstal beze změny. Aktivity APX a GR byly sníženy v nadzemní či v podzemní části nebo v obou zároveň, když byla stimulována aktivita GPX v nadzemní části.

Antioxidační enzymy GR a APX regenerují glutathion (GSH), tím přispívají k homeostázi ROS a redukují H_2O_2 pomocí askorbátu. Pokles množství APX a GR byl viditelný na fluorescenčních mikrofotografiích nadzemní části prostřednictvím zvýšeného vzniku ROS (Obrázek 4). Oproti tomu v podzemní části zvýšený nárůst ROS pozorovatelný nebyl (Obrázek 5). Fluorescence ROS a RNS (především oxidu dusnatého) byla tedy po vystavení deficitu N zvýšená v nadzemní části, ale ne v kořenech.

Množství flavonoidů se za nedostatku dusíku zvýšilo v kořenových špičkách. Zatímco v nadzemní části se množství flavonoidů v porovnání s rostlinami vyrůstajícími s dostatečným příjmem dusíku, nijak výrazně nezměnilo (viz Obrázek 4 a Obrázek 5). Reakci NPR (Neuova) činidla s fenoly zobrazuje na řezech stéblem a kořeny zelená fluorescence (Obrázek 4 a Obrázek 5). Neuově reakci se podrobněji věnuje kapitola 6.2.2. Při vystavení rostlin ječmene nedostatku dusíku byl pozorován nárůst zelené fluorescence, tj. nárůst množství fenolů, hlavně v kořenech, především v kořenové špičce a laterálních kořenech. Na řezu stéblem byl pod deficitem N pozorován spíše úbytek zelené fluorescence. Z výsledků vyplývá, že za deficitu N pravděpodobně dochází k přesouvání a/nebo k exsudaci fenolů z nadzemní části do kořenů.



Obrázek 4: Fluorescenčně obarvené kyslíkové radikály (ROS), radikály dusíku (RNS) a fenolické metabolity (NPR). Čerstvé ruční řezy stéblem ječmene setého (*Hordeum vulgare*) kultivované 15 dní za dostatku (+N) a nedostatku (-N) dusíku. Řezy byly vedeny 3cm nad bází stébla. Bílý pruh představuje 100 μ m. Převzato z: (Kovacik et al., 2014)



Obrázek 5: Fluorescenčně obarvené kyslíkové radikály (červeně), radikály dusíku (modře) a fenolické metabolity (detekované pomocí Neuova činidla, zeleně) v různých kořenech (hlavní kořen, postranní kořen) a v kořenové špičce ječmene setého (*Hordeum vulgare*) kultivované 15 dní za dostatku (+N) a nedostatku (-N) dusíku. Bílý pruh představuje 100 μ m. Převzato z: (Kovacik et al., 2014)

5.3 Sucho + teplo

Rollins et al., (2013) studovali odpověď rostlin ječmene na sucho a zvýšenou teplotu. Použili dva kultivary, Arta a Keel, které jsou geneticky odlišné, ovšem oba jsou adaptované na prostředí, které je náchylné k suchu. Rostliny byly týden kultivovány v teplotě 36/32°C (den/noc) a stres ze sucha byl vyvolán redukcí obsahu vody v rostlinách z 50 % na 15 %. Rostliny byly faktorům sucha a zvýšené teploty vystaveny jako samostatným stresorům i v kombinaci. Kultivar ječmene Arta reagoval na sucho snížením svého růstu víc než kultivar Keel. Za zvýšené teploty docházelo u kultivaru Arta k častější aborci semen v klasu než u kultivaru Keel. Kultivar Keel vykazoval vyšší výnosy pod stresovými podmínkami aplikovanými samostatně, zatímco kultivar Arta reagoval lépe na kombinaci stresorů. Kultivar Arta bude pravděpodobně lépe geneticky přizpůsoben ke změnám klimatu, které jsou v budoucnu očekávány.

5.4 UV

Stres z UV-B záření způsobuje zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). UV-B citlivé flavonoidy mají obecně potenciál ke snižování oxidativního poškození způsobeného krátkovlnným zářením. Kromě toho flavonoidy přispívají ke snižování rizika tvorby ROS zeslabováním pronikání UV-B záření do listů.

Klem et al., (2015) testovali efekt aklimace ječmene na UV záření při změněné intenzitě fotosynteticky aktivního záření (PAR) na obranný systém listů ječmene. Rostliny ječmene byly aklimovány ve třech kombinacích UV záření a PAR. Na studii použili kultivar ječmene Barke, citlivý na fotooxidativní poškození s nízkým obsahem flavonoidů a UV záření odolný kultivar Bonus. Hlavními fenolickými látkami v listech ječmene byly detekovány saponarin a lutoarin. Množství lutoarinu bylo pod všemi podmínkami manipulujícími s intenzitou UV a PAR větší v listech kultivaru odolného proti UV záření, tedy v kultivaru Bonus, než v kultivaru Barke citlivém na UV záření. Množství saponarinu bylo mírně vyšší v citlivém kultivaru Barke oproti odolnému kultivaru Bonus. Obsah lutoarinu se v listech ječmene zvýšil v odpovědi na vyšší ozáření UV, zatímco obsah saponarinu se výrazně nezvyšoval. Výsledky jsou v souladu s dalšími pracemi. Například Reuber et al., (1996) uvádí, že UV-B záření zvýšilo obsah lutoarinu o 500 % a saponarinu a dalších flavonů o 30 %. Stejně tak Schmitz-Hoerner and Weissenbock, (2003) uvádí pouze malé zvýšení množství saponarinu a pětikrát vyšší množství lutoarinu v listech ječmene.

6 Mikroskopické metody pro detekci a lokalizaci vybraných sekundárních metabolitů v pletivech listu.

Tato kapitola se věnuje metodám, pomocí kterých se zjišťuje obsah a lokalizace vybraných sekundárních metabolitů v pletivech rostlin, s důrazem na lokalizaci v ječmeni a obilninách. Nejprve jsou popsány metody biochemické a tradiční histochemické, dále je pak věnována zvýšená pozornost především metodám recentním, fluorescenčním.

Pro biochemickou analýzu obsahu fenolických sloučenin se velmi často používá metoda vysokoúčinné plynové chromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC) (Andersen and Markham, 2006; Shahidi and Naczsk, 2003). Pomocí této metody zjistíme, které látky se v dané části rostliny nacházejí, a zjistíme jejich přítomnost i ve velmi malých koncentracích. Nevýhodou metody HPLC je, že je pro tuto analýzu rostlinný materiál rozmělněn, tudíž nebudeme mít tušení, v jakých pletivech se ta která látka nacházela (Alejandra Moreno et al., 2015; Conejero et al., 2014; Markham et al., 1998; Mathesius et al., 1998; Mondolot et al., 2006; Nezval et al., 2017; Peer et al., 2001; Reuber et al., 1996)

Na zjištění lokalizace nespecifických indikátorů stresu, tj. fenolických látek, se používají histochemické metody, a to jak metody tradiční využívající světlo pole ve světelné mikroskopii, tak v dnešní době už více používané metody fluorescenční, využívající fluorescenční mikroskopii – těm bude z větší části věnována následující, závěrečná, část práce. Histochemická detekce a lokalizace fenolických látek jako jsou flavonoidy a antokyany nám umožňuje lépe pochopit jejich funkci nespecifických indikátorů stresu v rostlinných pletivech.

Sekundární metabolity flavonoidů jsou nepřekvapivě lokalizovány v základních epidermálních buňkách a v nesekrečních a žláznatých trichomech, které se nacházejí na okraji listů a dalších okrajových částech pletiv rostlin. Sekundární metabolity se tvoří v pletivech, kde bude s vysokou pravděpodobností nejúčinnější jejich ochranná funkce, což je ve vrstvách nejbližše lokalizovaných ke stresu např. z vysoké ozáření nebo působení UV záření, tj. v epidermis na povrchu listu. S přibývajícími metodami a jejich přesností bylo prokázáno, že se sekundární metabolity vyskytují nejen ve vakuolách a buněčných stěnách základních epidermálních buněk a v nesekrečních a žláznatých trichomech, ale i ve vakuolách mezofylových buněk a v chloroplastech (Agati and Tattini, 2010; Bidet et al., 2015; Hutzler et al., 1998; Schmitz-Hoerner and Weissenbock, 2003; Soukupová et al., 2000).

6.1 Tradiční histochemické metody

Histochemické metody umožňují určit přítomnost sledované látky pomocí chemické reakce dodané látky do vzorku s látkou přítomnou v rostlinném pletivu. Pokud interakcí dodané látky a sekundárního metabolitu vznikne barevný produkt, můžeme pomocí světlého pole ve světelném mikroskopu detekovat přítomnost sekundárního metabolitu v rostlinných pletivech. Takovéto metody řadíme mezi tradiční histochemické metody. Často tyto metody nejsou příliš specifické vůči jednotlivým druhům látek z určité skupiny organických látek. Například fenolické látky se mohou detekovat pomocí činidla Fast Blue BB. Při specifické reakci Fast Blue BB s fenolickými látkami je ve výsledku vidět barevný produkt této histochemické detekce, pro tuto reakci typické červenohnědé zbarvení v oblastech, kde se fenolické látky nacházejí. Další možná tradiční histochemická detekce pro širší skupinu fenolických látek je tzv. vanilinový test, kde se aplikuje vanilin spolu s HCl a dochází ke vzniku červenohnědého barevného produktu s kondenzovanými taniny (přehled viz Albrechtová et al., 2017).

6.2 Fluorescenční metody

Další možností pro lokalizaci fenolických látek v pletivech jsou histochemické metody, které využívají pro detekci dané látky fluorescenční mikroskopii. Fluorescenční mikroskopie je ideální pro stanovování lokalizace fenolických sloučenin, které jsou autofluorescentní či je možné je vizualizovat pomocí reakce s barvivem (například Neuovo činidlo), kdy vzniklá látka může emitovat fluorescenční záření a umožňuje tak jejich vizualizaci fluorescenční mikroskopií (Hutzler et al., 1998).

6.2.1 Principy fluorescenčních metod

Zjednodušeně řečeno, principem fluorescence je absorpce elektromagnetického záření elektrony a následná deexcitace (uvolnění energie) zářením neboli fluorescencí. Fluorescenční mikroskop je optický mikroskop využívající fluorescenci k zobrazení organických i anorganických struktur.

Fluorochromy (fluorofory či fluorescenční barviva) jsou jakékoliv látky, které jsou po ozáření světlem o určité vlnové délce schopny světlo vyzářit zpátky, ale v jiné vlnové délce. Fluorochrom se váže například na určitou strukturu či molekulu čímž lze v buňce lokalizovat určitou organelu či produkt metabolismu, např. sekundární metabolit. O primární fluorescenci mluvíme, pokud vzorek sám o sobě obsahuje nějaké fluorochromy a vykazuje určitou míru fluorescence, např. chlorofyl. Sekundární fluorescence je pozorována po přidání nějakého

fluorochromu do vzorku, který označí cílové struktury či metabolity, původně nefluorescenční (Botanika, UPOL [online]). Abychom mohli pozorovat pouze fluoreskující strukturu, tzn. pouze světlo emitované fluorochromem a tedy světlo jen o určité vlnové délce, je třeba nežádoucí vlnové délky odstranit. Eliminace nechtěných vlnových délek se děje prostřednictvím patřičných filtrů, které jsou schopny propustit světlo jen o určité vlnové délce (Olympus [online]).

Výhodou fluorescenčních histochemických metod je lepší specifická detekce sledované látky. Nejčastěji využívanou fluorescenční metodou pro detekci různých skupin fenolických látek je Neuova reakce, které bude věnována následující kapitola. Další kapitolou pak bude lokalizace fenolických látek pomocí Neuovy reakce spolu s dalšími mikroskopickými technikami.

6.2.2 Lokalizace vybraných sekundárních metabolitů pomocí Neuovy reakce

V této podkapitole se zaměřím na práce s ekofyziologickou a funkční interpretací vlivu podmínek prostředí na lokalizaci různých typů fenolických látek pomocí Neuovy reakce a fluorescenční mikroskopie. Vzhledem k malému počtu literatury, která se věnuje lokalizaci vybraných sekundárních metabolitů v listech ječmene, jsou zde zařazeny i příklady lokalizace z jiných rostlin.

Neuovo činidlo (Neu's reagent = Naturstoff reagent A (NA) = DPBA = 2-aminoetyldifenylborinát, Sigma) nebo také NPR činidlo (natural product reagent) je boritá sůl, která formuje s některými fenolickými látkami komplexy a emituje specifickou fluorescence pod UV světlem, čím zviditelňuje různé skupiny fenolických látek odlišným způsobem, jak je popsáno v Tabulce 1 (Nicole and Gianinazzi-Pearson, 1996). Reakci flavonoidů s Neuovým činidlem označuje jasně žlutá až oranžová fluorescence (Alejandra Moreno et al., 2015; Conejero et al., 2014; Hutzler et al., 1998; Mathesius et al., 1998; Matteini et al., 2011; Mondolot et al., 2006; Peer et al., 2001; Schmitz-Hoerner and Weissenbock, 2003).

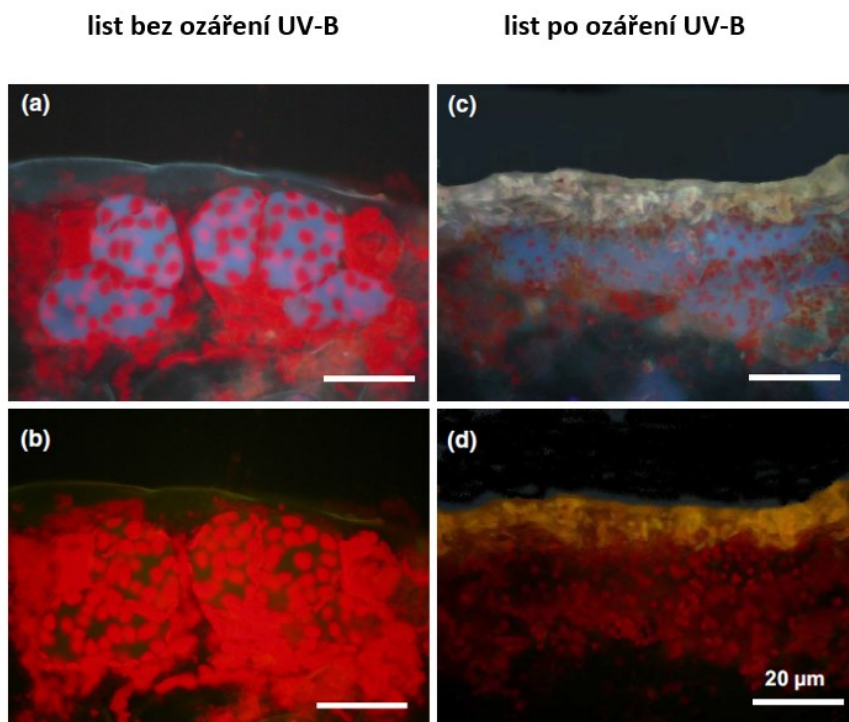
| Fenolické látky a jejich deriváty | Absorpční maximum | Barva |
|--|-------------------|-------------------|
| kyselina kávová a její deriváty | 380nm | zeleno-bílá |
| kyselina galová a její deriváty | 325nm | tmavě modrá |
| kyselina galokatechová a její deriváty | 325nm | tmavě modrá |
| flavonoidy | 410nm | žlutá až oranžová |

Tabulka 1: Barva fluorescence fenolických látek a jejich derivátů pod UV světlem, po ošetření Neuovým činidlem. Převzato z: (Nicole a Gianinazzi-Pearson, 1996).

V pracích, které se věnují fenolickým látkám detekovaným pomocí Neuova činidla, je jejich lokalizace většinou popsána deskriptivním způsobem bez kvantifikace intenzity detekce. Neuovo činidlo bylo tradičním způsobem použito i v předchozí práci týmu prof. Albrechtové při lokalizaci fenolických látek v jehlicích smrku ztepilého a smrku pichlavého (Soukupová et al., 2000 a 2001).

Při pozorování lokalizace fenolických látek epifluorescenčním mikroskopem lze použít různé druhy filtrů, aby mohlo být dobře pozorováno emisní záření, pomocí kterého jsou cílové látky či struktury pozorovány. Bidel et al., (2015) takto pozorovali pomocí epifluorescenčního mikroskopu a dvou druhů filtrů množství flavonolů v listech pupečníku asijského (*Centella asiatica* (L.) Urban), které byly vystaveny UV záření. Použili při tom Neuovo činidlo a sadu excitačních filtrů Nikon UV-1A (excitační filtr propouštějící vlnové délky 360-370 nm a emisní filtr propouštějící vlnové délky od 420nm výše) a sadu B-2A (excitační filtr propouštějící vlnové délky 450-490 nm a emisní filtr propouštějící vlnové délky od 515 nm výše). Flavonoly měly při pozorování epifluorescenčním mikroskopem při použití Neuova činidla šedo-žlutou (Obrázek 6c (Nikon UV-1A)) a oranžovou barvu (Obrázek 6d (Nikon B-2A)). Palisádový parenchym vyzařoval modrou fluorescenci v buňkách vystavených i nevystavených UV záření, která je charakteristická pro estery kyseliny kávové a chinové s použitím UV-1A filtru (Obrázek 6a, c). Červená autofluorescence chlorofylu byla redukována při vystavení rostlin UV záření (Obrázek 6a, b oproti c, d), což naznačuje, že mohlo dojít k poškození chloroplastů.

Z pozorování lokalizace za použití Neuova činidla vyplývá, že při použití epifluorescenčního mikroskopu k zobrazování sekundárních metabolitů či jiných látek je důležité brát v potaz, která část barevného spektra je potřebná k excitaci fluorescence tak, aby byly látky dobře viditelné a navzájem rozlišitelné. Ale i tak bez současné detekce s použitím chromatografické HPLC metody, není možné jednoznačně fenolické látky určit.



Obrázek 6: Histologická lokalizace hlavních skupin fenolických látek v příčných řezech listem *Centella asiatica* před (a, b) a po (c, d) vystavení listů UV-B záření. Modrá fluorescence pod filtrem Nikon UV-1A, představuje estery kyseliny kávové a chinové (a, c). Flavonoly vytvářející komplex s Neuovým činidlem fluoreskují s použitím filtru Nikon UV-1A žlutě (c) a s filtrem Nikon B-2A fluoreskují oranžově. Červená fluorescence chlorofylu poklesla po vystavení listů UV-B záření (a, b vs. c, d). Neuovo činidlo, epifluorescence, bílé pruhy představují měřítko 20µm. Převzato z: (Bidel et al., 2015).

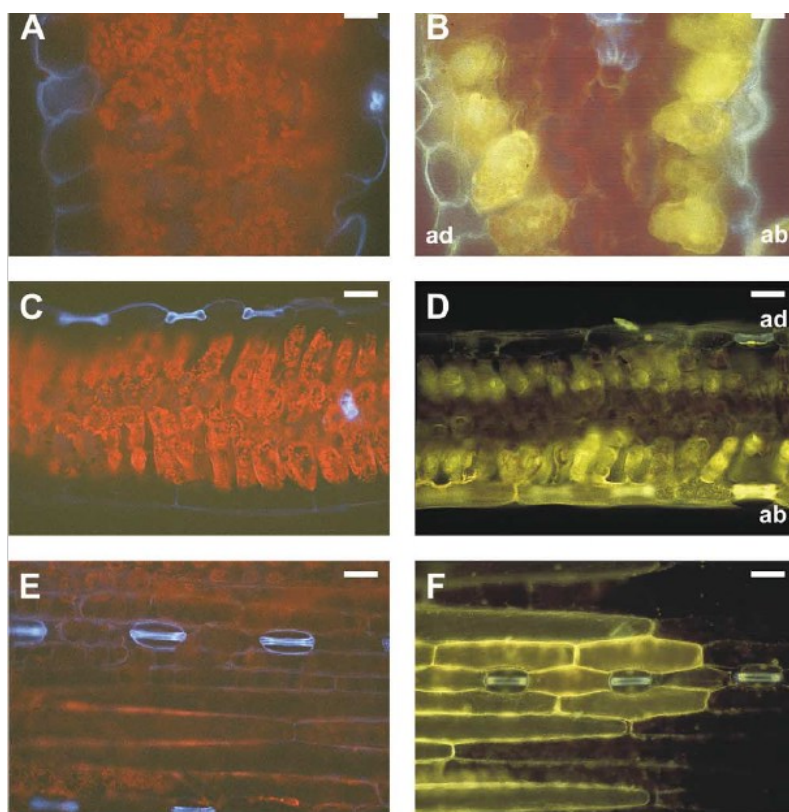
6.2.3 Lokalizace vybraných sekundárních metabolitů pomocí Neuovy reakce v kombinaci s HPLC určením těchto látek

Histochemická detekce různých skupin fenolických látek pomocí Neuovy reakce se v současnosti často využívá ve spojení s HPLC chromatografií, která umožňuje přesné určení jednotlivých typů fenolických látek ve studovaném materiálu.

Příkladem práce využívající histochemickou detekci fenolických látek pomocí Neuova činidla a HPLC identifikace obsahu jednotlivých fenolických látek pro popis viditelných změn v lokalizaci a množství flavonů na ječmenu je studie autorů Schmitz-Hoerner and Weissenbock, (2003). Množství flavonů bylo zjišťováno po vystavení rostlin ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) zvýšené dávce UV záření. Bez Neuova činidla byla vidět červená fluorescence chlorofylu v mezofylu a bílo-modrá autofluorescence buněčných stěn epidermálních buněk a buněk průduchů s vedlejšími buňkami (Obrázek 7A, C, E). Po přidání Neuova činidla se objevila žlutá fluorescence typická pro flavony. Tato fluorescence byla patrná v adaxiální i abaxiální straně epidermis, přičemž v abaxiální straně byla žlutá fluorescence výraznější, dále v buňkách

průduchů a v buněčné vrstvě mezofylu, která byla od středu buňky nejvzdálenější (Obrázek 7B, D, F). Buňky, jejichž obsah se během přípravy vzorku vylil, neukazují žádnou fluorescenci (Obrázek 7F). To, že v rozbitých buňkách není pozorována fluorescence, naznačuje, že signály flavonů z nepoškozených buněk jdou z protoplastu, a ne z buněčných stěn.

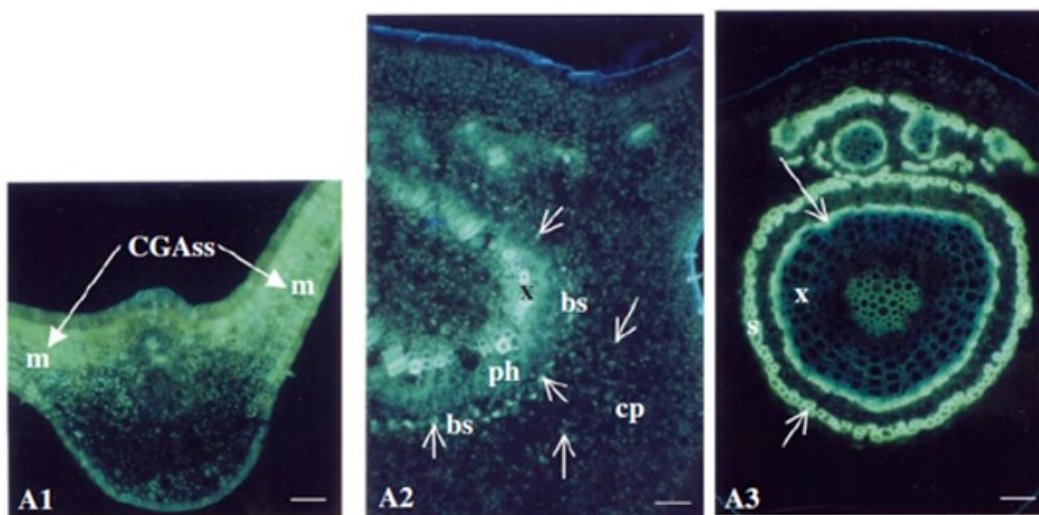
V této studii (Schmitz-Hoerner and Weissenbock, 2003), autoři také zkoumali, zda bude pomocí fluorescence rozeznatelný flavon luteolin od saponarinu. Luteolin by měl být rozeznatelný oranžovo-žlutou fluorescencí, zatímco saponarin výraznou žlutou fluorescencí. Kaspar et al., (2010) píše, že se saponarin akumuluje v epidermálních vrstvách, ale už ne v mezofylu. Lokalizace saponarinu v epidermis napovídá, že by měl představovat hlavní flavonoid, který bude ochraňovat rostlinu před vysokým ozářením a UV zářením. Na fluorescenčních mikrofotografiích (Obrázek 7) z práce (Schmitz-Hoerner and Weissenbock, 2003) však žádná oranžovo-žlutá fluorescence odpovídající luteolinu není, ačkoli je pomocí metody HPLC změřeno, že se celkový obsah luteolinu oproti normální dávce UV záření zvýšil. Autoři to vysvětlují tak, že fluorescence luteolinu jakožto vedlejší sloučeniny, není i přes své zvýšené hodnoty viditelná, právě kvůli nízkým koncentracím nebo kvůli žluté fluorescenci saponarinu, kterého je více. Právě z důvodu možného překrývání fluorescencí jednotlivých látek je vhodné kombinovat metody fluorescenční mikroskopie s jinými či použít jinou fluorescenční metodu než tu, která byla použita zde, například lze použít konfokální mikroskopii, o které budu psát níže.



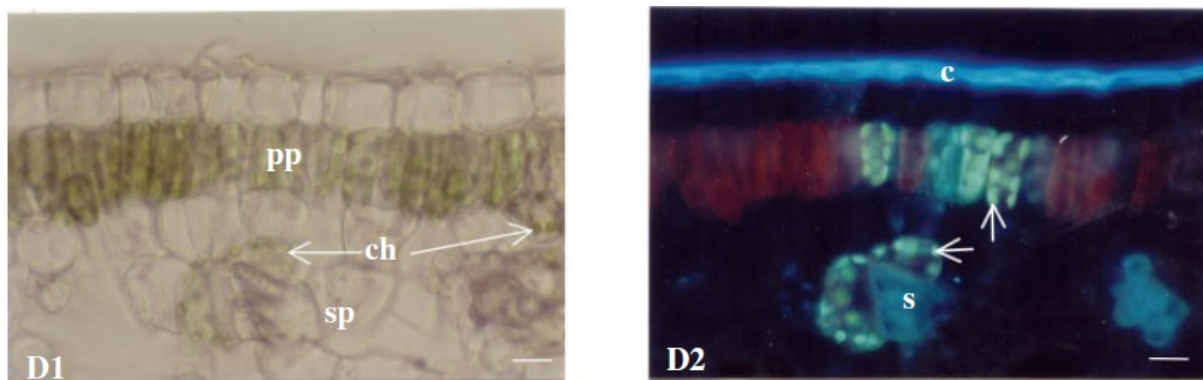
Obrázek 7: Fluorescenční mikrofotografie příčných (A, B), podélných (C, D) a paradermálních (E, F) řezů listů ječmene, vystavených zvýšenému množství UV záření. Autofluorescence (A, C, E) a fluorescence po použití Neuova činidla (B, D, F). Bílý pruh představuje 25 μ m (A, B, E, F) a 50 μ m (C, D). Písmena ab = abaxiální strana listu a ad = adaxiální strana listu. Převzato z (Schmitz-Hoerner and Weissenbock, 2003).

Mondolot et al., (2006) zmiňují při použití Neuova činidla ještě zeleno-bílou fluorescenci v listech *Coffea canefora* (kávovník statný), která je typická pro estery kyseliny kávové a chinové (CGAss = caffeoylquinic acids), kterou emitují pod UV světlem. Autoři upozorňují na nedostatek této metody a to, že nejde odlišit mono- a diestery CGAss, tudíž je opět vhodné použít tuto metodu spolu s dalšími, které dokáží podrobněji určit látky ve vzorku například s výše zmíněnou chromatografickou metodou HPLC. V nezralých čepelích listů byly CGAss specificky lokalizovány v chlorenchymatických buňkách, kde se zdálo, že jsou spojeny s chloroplasty (Obrázek 8 A1). V dospělých čepelích listů byla zeleno-bílá fluorescence CGAss také zaznamenána ve stěnách cév xylému (Obrázek 8 A2), ovšem liší se od modré fluorescence ligninů ve starých cévách xylému ve stárnoucím listu (Obrázek 8 A3).

Díky metodám lokalizace sekundárních metabolitů je možné usuzovat na mechanismy ochrany rostlin před stresovými faktory prostředí. Například ve studii (Mondolot et al., 2006) se autoři domnívají, že pozorované spojení mezi CGAss a chloroplastem v nově vzniklých orgánech naznačuje, že CGAss možná hrají speciální roli v ochraně chloroplastů proti světelnému poškození (Obrázek 9 D2). Jiná jejich hypotéza říká, že důvodem pro blízké spojení CGAss s chloroplastem je, že syntéza CGAss probíhá v chloroplastech a sloučeniny, které z nich vychází, se pak budou ukládat ve vakuolách. Další zajímavostí je, že CGAss byly přítomny v cévních svazcích, což napovídá tomu, že jsou v těle rostliny transportovány z místa na místo. Zároveň se CGAss nacházejí v buněčných stěnách xylému, což podněcuje autory k názoru, že možná hrají roli v budování buněčných stěn.

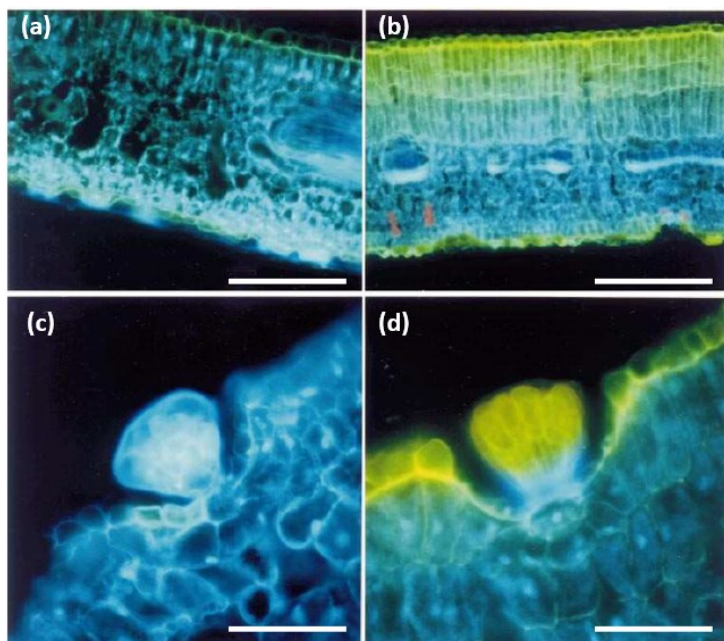


Obrázek 8: Histochemická lokalizace esterů kávové a chinové kyseliny (CGAss) pomocí Neuova činidla v příčných řezech listy *Coffea canefora*. A1: Mladé listy *C. canefora*. Specifická zeleno-bílá fluorescence CGAss (šipky), která je koncentrována v mezofylu (m). A2: Dospělý list *C. canefora*. Pokles specifické fluorescence CGAss (šipky) a disperze v kortikálním parenchymu (cp). Lokalizace CGAss v buňkách pochev cévních svazků (bs), dále ve floému (ph) a v buněčných stěnách xylému (x). A3: Stárnoucí list *C. canefora*. Zeleno-bílá fluorescence CGAss (šipky) v buněčných stěnách nově vzniklého xylému (x) a ve sklerenchymu (s). Modrá fluorescence ligninů v buněčných stěnách starého xylému (x), fluorescence pod UV světlem. Bílý pruh představuje 74 μm (A1, A2, A3). Převzato z (Mondolot et al., 2006).



Obrázek 9: Příčné řezy čepeli listu *Coffea canefora*. D1: chloroplasty (ch), palisádový parenchym (pp), houbový parenchym (sp); viditelné světlo. D2: zeleno-bílá fluorescence esterů kyseliny kávové a chinové (šipky) v chloroplastech kde byl rozpuštěn chlorofyl, jasně modrá fluorescence derivátů esterů kyseliny ferulové a chinové (feruloylquinic derivatives) v kutikule (c), modrá fluorescence hydroxyskořicových sloučenin (hydroxycinnamic compounds) vázaná na buněčné stěny sklerenchymu (s), červená fluorescence nerozpuštěného chlorofylu; UV světlo, Neuova reakce. Bílý pruh představuje 18 μm. Převzato z (Mondolot et al., 2006).

(Tattini et al., 2000) zkoumali akumulaci flavonoidů v pletivech a žláznatých trichomech u zastíněných a osluněných listů u jamovce širokolistého (*Phillyrea latifolia* L.) Pomocí metody HPLC byly hlavní flavonoidy identifikovány jako quercetin-3-*O*-rutinosid a luteolin-7-*O*-glukosid. Dále byla použita metoda HPTLC (highperformance thin-layer chromatography), při které byl vzorek postříkán Neuovým činidlem a následně byla porovnávána fluorescence fenylypropanoidů a flavonoidů ze zastíněných a osluněných listů s jejich standardy. Metodou HPTLC se potvrdil fakt vyplývající z výsledků fluorescenční mikroskopie a to, že se flavonoidy výrazně akumulovaly v osluněných listech (Obrázek 10b, d), oproti listům zastíněným (Obrázek 10a, c). Překvapující byl rozdíl v akumulaci fenylypropanoidů mezi pletivou listu a žláznatými trichomy u osluněných oproti zastíněným listům. Zatímco v pletivech se po ozáření listu změnilo pouze množství fenylypropanoidů, ve žláznatých trichomech se změnilo také jejich složení. Z toho vyplývá, že fenylypropanoidy vylučované žláznatými trichomy se pravděpodobně tvoří v buňkách sekrečních orgánů a ne jinde, odkud by do trichomů putovaly.



Obrázek 10: Listy *Phillyrea latifolia*, které byly aklimovány ve stínu (a, c) a při plné ozáření (b, d). Histochemická lokalizace flavonoidů (žlutá) pomocí Neuova činidla v příčných řezech listem (a, b) a žláznatými trichomy (c, d). Bílý pruh představuje měřítko 200 μm (a, b) a 50 μm (c, d). Převzato a upraveno dle (Tattini et al., 2000)

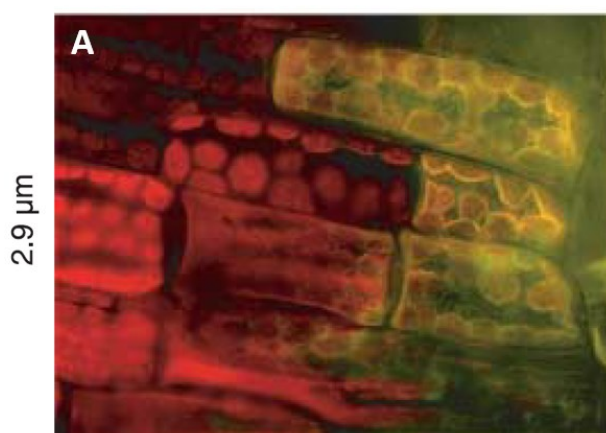
6.2.4 Lokalizace vybraných sekundárních metabolitů pomocí kombinace Neuova činidla a jiných zobrazovacích a analytických metod

V dalším přehledu se zaměřím na recentní práce, kde je Neuovo činidlo použito ve spojení s recentními či novými analytickými a zobrazovacími metodami.

Z 2D snímků z fluorescenčního mikroskopu lze sestavit i 3D obraz pozorovaného objektu. Při sestavování 3D obrazu lze použít metodu 3D dekonvoluční fluorescenční mikroskopie (three-dimensional deconvolution fluorescence microscopy). Dekonvolucí je

myšleno upravení obrazu tak, aby byl obraz co nejméně zkreslený a zašuměný. Dekonvoluce je v podstatě matematická metoda korekce objektů pro dosažení vyšší ostrosti obrazu. Výhodou dekonvoluční mikroskopie, oproti například konfokální je, že jí může být dosaženo i při nízké hladině světla, což je výhodné při pozorování živých vzorků citlivých na světlo (McNally et al., 1999). 3D dekonvoluční mikroskopii lze využít i k subcelulární lokalizaci flavonoidů v pletivech, například jejich pravděpodobná lokalizace v membráně chloroplastů (

Obrázek 11). K vzorkům pletiv z listů rostlin je přidáno Neuovo činidlo, stejně jako při klasické fluorescenční mikroskopii a postupně jsou pořizovány snímky různými rovinami vzorku, postupující od vnějšku dovnitř (Agati et al., 2007).



*Obrázek 11: Snímek z 3D dekonvoluční mikroskopie palisádového parenchymu ozářených listů *Phillyrea latifolia*. K vzorku bylo přidáno Neuovo činidlo. Žlutá barva představuje fluorescenci flavonoidů a červená fluorescenci chlorofylu. Snímek je pořízen z vrstvy 2,9 μm od povrchu vzorku. Převzato a upraveno dle (Agati et al., 2007).*

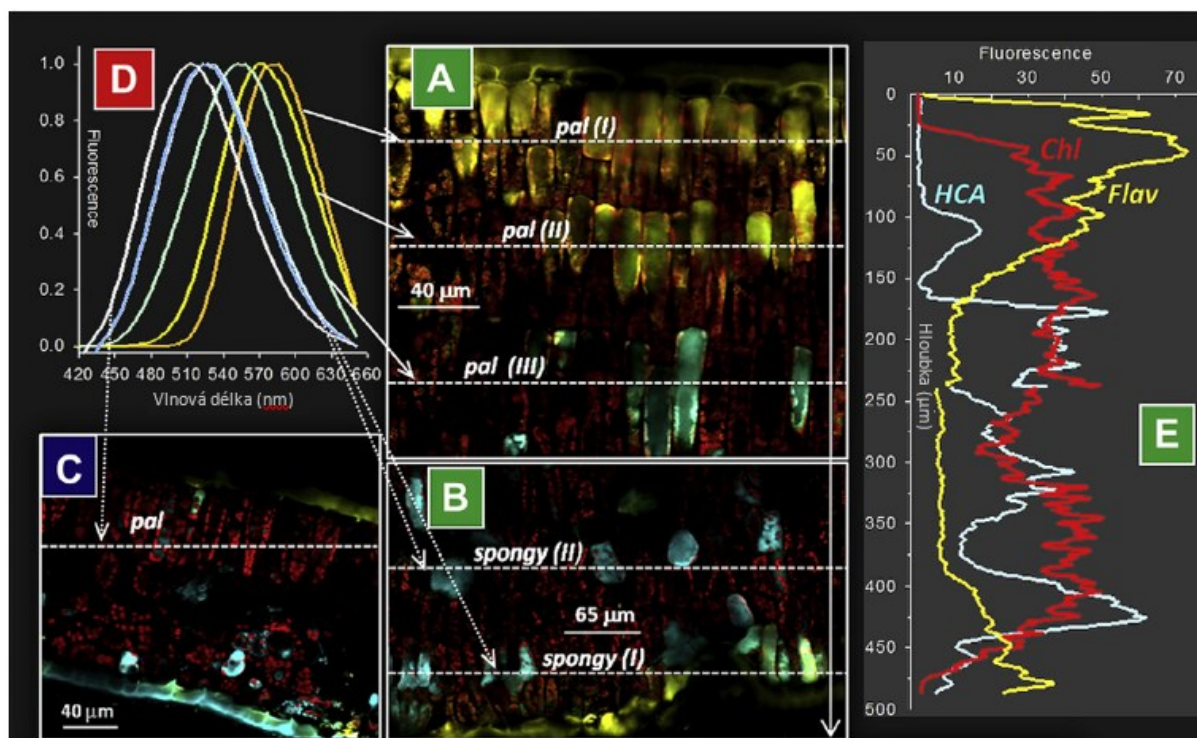
Další, v recentních pracích často používanou, mikroskopickou metodou je konfokální mikroskopie. Mikroskopické metody typu CLSM (confocal laser scanning microscopy = LSCM = Laser scanning confocal microscopy) lépe zobrazují lokalizaci fenolických látek v pletivech než klasická fluorescenční mikroskopie, jelikož oproti klasické světelné mikroskopii mají snímky z konfokální mikroskopie vyšší rozlišení a kontrast a je potlačen signál nad a pod rovinou zaostření a tím se vyloučí informace mimo oblast zaostření (Leica microsystems [online]). Předností, a zároveň i omezením této mikroskopické metody, je využití laseru jako zdroje světla, intenzivní osvětlení vzorku přispívá k rychlejšímu vysvícení použitých fluorochromů a to nejen v místě snímání, ale i v místech kudy paprsek prochází k místu zaostření (Agati et al., 2009; Hutzler et al., 1998). V konfokální mikroskopii je opět použito Neuova činidla k zobrazení fenolických látek v pletivech listů rostlin (Agati et al., 2012, 2013).

Typem konfokální mikroskopie je multifluorescenční konfokální mikroskopie, což je mikroskopie kombinovaná se spektrální analýzou, což umožňuje odlišení jednotlivých struktur i v případě fluorochromů, které mají blízká emisní maxima (Agati et al., 2012, 2013). Vzorky jsou

obarveny několika barvivou současně a stanovuje se intenzita jejich fluorescence současně v čase i ve stejném místě. Excitační a emisní spektra jednotlivých barviv se často překrývají, v důsledku dochází k tomu, že při použití optických filtrů, jako je tomu u fluorescenční mikroskopie, je obraz rušen překrývajícími se fluorescencemi jednotlivých barviv, případně autofluorescencí. Překrývání fluorescence je problémem obzvláště pokud jsou barviva promíchána i prostorově viz výše zmíněná práce autorů Schmitz-Hoerner and Weissenbock, (2003). Problém mísení fluorescence je řešen právě pomocí spektrálního zobrazování. Při spektrálním zobrazování dochází ke stanovení podílu jednotlivých fluorescence ve spektru naměřeném při spektrálním zobrazení vzorku (pořízení série obrazů při měnící se vlnové délce), což posléze usnadní identifikaci jednotlivých látek (Plášek, 2004).

Multifluorescenční konfokální mikroskopii použili pro zjištění lokalizace flavonoidů a derivátů kyseliny hydroxyskořicové (HCA) v listech *Phillyrea latifolia* vystavených vysoké ozáření například (Agati et al., 2013). Příčné řezy listem byly nejdříve obarveny Neuovým činidlem a následně použili metodu multifluorescenční konfokální mikroskopie, získali snímky s viditelnou fluorescence v pletivech, měnící se intenzitou fluorescence napříč řezem a fluorescence spektra jednotlivých látek (Obrázek 12). Díky této kombinaci výsledků, které získali, je jasně viditelná distribuce flavonoidů a HCA v pletivech listu. Flavonoidy se akumulovaly především na ozářené adaxiální straně listu (Obrázek 12A), zatímco HCA byly lokalizovány u neozářené abaxiální straně listu (Obrázek 12B) a ve žláznatých trichomech neozářených listů.

Akumulaci HCA v neozářených částech listu, v tomto případě derivátů kyseliny kávové, zaznamenali i Tattini et al., (2000) z jejichž výsledků se zdá, že vysoká ozáření má vliv na metabolickou dráhu fenyylpropanoidů a to ve formě deaktivace biosyntetické cesty vedoucí ke vzniku HCA. Antioxidační aktivita flavonoidů převažuje nad antioxidační aktivitou HCA a z toho důvodu je jich v ozářených částech listů tvořeno více, nicméně výsledky také naznačují, že HCA mají pozitivní vliv na narůstání obsahu ligninu při vysoké ozáření a tím se podílí na tloušťnutí buněčných stěn, což by mohlo být využito jako indikátor stresu z vysoké ozáření (Agati et al., 2013; Tattini et al., 2000).



Obrázek 12: Na obrázcích je vidět fluorescence derivátů kyseliny hydroxyskořicové (HCA= hydroxycinnamates, zeleno-modrá barva), flavonoidů (Flav, žlutá barva) a chlorofylu (Chl) na adaxiální (A) a abaxiální (B) straně osluněného listu a na listu zastíněném (C). Na obrázku (E) jsou vidět změny v intenzitě fluorescence HCA, flavonoidů a chlorofylu při průchodu celým osluněným listem. HCA se neakumulují zhruba prvních 100μm od adaxiální strany epidermis osluněného listu (A a E). Flavonoidy se oproti tomu v prvních 150μm osluněného listu akumulují mnohem více (E). Akumulace flavonoidů v horních částech listu odpovídá fluorescenčním spektrům na obrázku (D) ve dvou horních vrstvách palisádového parenchymu, které mají vrchol v 585 and 575nm. Flavonoidy se vyskytují i v houbovém parenchymu osluněného listu, ale už ne tolik jako v palisádovém parenchymu. HCA na druhou stranu převažují nad flavonoidy v hlubších vrstvách osluněného listu (E). (pal (I)): první vrstva palisádového parenchymu; (pal (II)): druhá vrstva palisádového parenchymu; (pal (III)): třetí vrstva palisádového parenchymu; (spongy (I)): první vrstva houbového parenchymu; (spongy (II)): druhá vrstva houbového parenchymu. Neuovo činidlo, multifluorescenční konfokální mikroskopie. Převzato z (Agati et al., 2013).

6.2.5 Závěry o výzkumu lokalizace vybraných sekundárních metabolitů pomocí fluorescenčních metod

Z výše uvedených příkladů prací vyplývá, že při výzkumu lokalizace fenolických látek je vhodné si pokus velmi dobře promyslet. Osvědčeným barvivem pro vizualizaci různých druhů fenolických látek ve vzorku je Neuovo činidlo. Dále jsou důležitými faktory například podobnost zkoumaných sekundárních metabolitů a blízkost jejich emisních spekter, která může být při pozorování fluorescenčním mikroskopem na obtíž. Zároveň je důležité uvědomit si citlivost daného vzorku, jelikož u velmi citlivých vzorků na světlo nemusí být vhodná například konfokální mikroskopie.

Závěr

V současnosti probíhající klimatická změna vytváří změny faktorů prostředí, které u rostlin mohou vyvolat stres. Pro lidskou populaci viditelným důsledkem stresových faktorů, které na rostliny působí, je negativní změna výnosnosti zemědělských plodin, vyšší náchylnost k chorobám a menší odolnost vůči rychlým změnám podnebí a počasí. Tyto negativní důsledky na hospodářských plodinách, především pak na obilovinách, které z velké části lidstvo živí, je nutné co nejvíce eliminovat, jinak může dojít k ohrožení potravinové bezpečnosti lidstva. Na příkladu ječmene, případně dalších obilovin, jsem se pokusila ukázat, jakým stresovým faktorům hospodářské rostliny čelí a jaké jsou jejich možnosti obrany. Zájmem lidstva je kultivace co nejodolnějších rostlin, které by klimatickým změnám dokázaly odolávat. Abychom však mohli takovéto rostliny vypěstovat, je nutné znát jejich ochranné mechanismy a umět určit stav, kdy už se rostlina nachází ve stresu. Odolnost rostlin studujeme pomocí nespecifických indikátorů stresu, jako je akumulace a detekce fenolických látek, patřících mezi významné sekundární metabolity, které rostlinu před stresem chrání a signalizují, že se rostlina ve stresu nachází.

Na určení obsahu fenolických látek můžeme použít například metody biochemické, chromatografické jako je HPLC. Tyto metody neurčí přesnou lokalizaci či akumulaci v jednotlivých typech pletiv či jejich částech, zato velmi přesně identifikují různé druhy sloučenin, které se v rostlině nachází a též přesně určí množství těchto látek.

Pro přesnější lokalizaci je třeba využít histochemických detekcí. K dispozici jsou tradiční histochemické metody, které však obvykle nejsou příliš specifické vůči detekovaným látkám. Například k určení celé skupiny fenolických látek slouží Fast Blue BB či vanilinový test, který slouží k detekci taninů.

Fluorescenční metody jsou oproti tradičním histochemickým metodám specifitější. Nejčastěji používanou metodou, pro zobrazování fenolických látek je Neuova reakce. Neuova reakce umožňuje rozeznat jednotlivé fenolické látky podle jejich specifické fluorescence, která v reakci na přidání Neuova činidla do vzorku vznikne. Kombinace aplikace Neuova činidla s moderními zobrazovacími a spektroskopickými metodami umožňuje velmi přesné určení a lokalizaci jednotlivých fenolických látek ve vzorku. Především pak je významná možnost rozlišení látek i s velmi podobnými fluorescenčními spektry, což by například s použitím tradičních histochemických metod nebylo možné a dále pak zobrazení struktur i v 3D obraze, což napomáhá lepší prostorové orientaci v distribuci fenolických látek. Nejlepším postupem při

zkoumání lokalizace fenolických látek v pletivech listu se zdá být kombinace několika metod, čímž se snižuje riziko nepřesného určení fenolických látek a nepřesné lokalizace ve vzorku.

Pokud dokážeme úspěšně detekovat a lokalizovat nespecifické indikátory stresu, můžeme vytipovat vhodné genotypy obilovin, odolné vůči stresovým podmínkám vyvolaných klimatickou změnou. Pokud budou následně vhodné genotypy hospodářských plodin kultivovány a použity v zemědělství, bude moci experimentální biologie rostlin přispět ke stabilizaci potravinové bezpečnosti lidstva, která je dnes ohrožena.

Seznam zdrojů a použité literatury

- Agati, G., and Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist* 186, 786–793.
- Agati, G., Matteini, P., Goti, A., and Tattini, M. (2007). Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist* 174, 77–89.
- Agati, G., Stefano, G., Biricolti, S., and Tattini, M. (2009). Mesophyll distribution of “antioxidant” flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. *Ann Bot* 104, 853–861.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., and Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 196, 67–76.
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., and Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* 72, 35–45.
- Albrechtová, J., Kupková, L., Campbell, P., and a kol. (v tisku 2017). Metody hodnocení fyziologického stavu smrkových porostů. Česká geografická společnost, Praha, ISBN 978-80-904521-9-0.
- Alejandra Moreno, M., Ines Mercado, M., Nuno, G., Catiana Zampini, I., Soledad Cuello, A., Ines Ponessa, G., Esteban Sayago, J., and Ines Isla, M. (2015). Histochemical localization and characterization of chalcones on the foliar surface of *Zuccagnia punctata* Cav. Insights into their physiological role. *Phytochem. Lett.* 13, 134–140.
- Alemayehu, F.R., Frenck, G., Linden, L. van der, Mikkelsen, T.N., and Jørgensen, R.B. (2014). Can barley (*Hordeum vulgare* L. s.l.) adapt to fast climate changes? A controlled selection experiment. *Genet Resour Crop Evol* 61, 151–161.
- Andersen, O.M., and Markham, K.R. (2006). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press, USA, ISBN: 978-0-8493-2021-7.
- Barnabás, B., Jäger, K., and Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell & Environment* 31, 11–38.
- Bezemer, T.M., and Jones, T.H. (1998). Plant-Insect Herbivore Interactions in Elevated Atmospheric CO₂: Quantitative Analyses and Guild Effects. *Oikos* 82, 212–222.
- Bidel, L.P.R., Chomicki, G., Bonini, F., Mondolot, L., Soulé, J., Coumans, M., Fisca, P.L., Baissac, Y., Petit, V., Loiseau, A., et al. (2015). Dynamics of flavonol accumulation in leaf tissues under different UV-B regimes in *Centella asiatica* (Apiaceae). *Planta* 242, 545–559.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L. (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Wiley, USA, ISBN: 978-0-943088396.
- Clausen, S.K., Frenck, G., Linden, L.G., Mikkelsen, T.N., Lunde, C., and Jørgensen, R.B. (2011). Effects of Single and Multifactor Treatments with Elevated Temperature, CO₂ and Ozone on Oilseed Rape and Barley. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197, 442–453.
- Conejero, G., Noirot, M., Talamond, P., and Verdeil, J.-L. (2014). Spectral analysis combined with advanced linear unmixing allows for histolocalization of phenolics in leaves of coffee trees. *Front. Plant Sci.* 5, 39.

- Hakala, K., Jauhiainen, L., Himanen, S.J., Rotter, R., Salo, T., and Kahiluoto, H. (2012). Sensitivity of barley varieties to weather in Finland. *J. Agric. Sci.* *150*, 145–160.
- Heldt, H.-W., and Heldt, F. (2005). *Plant Biochemistry*. Elsevier Academic Press, USA, ISBN: 0-12-088391-033.
- Hutzler, P., Fischbach, R., Heller, W., Jungblut, T.P., Reuber, S., Schmitz, R., Veit, M., Weissenböck, G., and Schnitzler, J.-P. (1998). Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J Exp Bot* *49*, 953–965.
- Iason, G.R., Dicke, M., and Hartley, S.E. (2012). *The Ecology of Plant Secondary Metabolites: From Genes to Global Processes*. Cambridge University Press, United Kingdom, ISBN: 978-0-521-19326-9.
- IPCC (2013). Working Group I Report “Climate Change 2013: The Physical Science Basis.”. Cambridge University Press, United Kingdom, USA, ISBN: 978-1-107-05799-1.
- IPCC (2014a). Fifth Assessment Report - Synthesis Report. Cambridge University Press, Geneva, ISBN 978-92-9169-143-2.
- IPCC (2014b). Working Group III Report “Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change.”. Cambridge University Press, United Kingdom, USA, ISBN 978-1-107-05821-7.
- IPCC (2014c). Working Group III Report “Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change” - Summary for Policymakers. Cambridge University Press, United Kingdom, USA.
- Kaspar, S., Matros, A., and Mock, H.-P. (2010). Proteome and Flavonoid Analysis Reveals Distinct Responses of Epidermal Tissue and Whole Leaves upon UV–B Radiation of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seedlings. *J. Proteome Res.* *9*, 2402–2411.
- Klem, K., Holub, P., Štroch, M., Nezval, J., Špunda, V., Tříška, J., Jansen, M.A.K., Robson, T.M., and Urban, O. (2015). Ultraviolet and photosynthetically active radiation can both induce photoprotective capacity allowing barley to overcome high radiation stress. *Plant Physiology and Biochemistry* *93*, 74–83.
- Kovacik, J., Klejdus, B., Babula, P., and Jarosova, M. (2014). Variation of antioxidants and secondary metabolites in nitrogen-deficient barley plants. *J. Plant Physiol.* *171*, 260–268.
- Lhotáková, Z., Urban, O., Dubánková, M., Cvikrová, M., Tomášková, I., Kubínová, L., Zvára, K., Marek, M.V., and Albrechtová, J. (2012). The impact of long-term CO₂ enrichment on sun and shade needles of Norway spruce (*Picea abies*): Photosynthetic performance, needle anatomy and phenolics accumulation. *Plant Science* *188*, 60–70.
- Long, S.P., Ainsworth, E.A., Leakey, A.D.B., Nösberger, J., and Ort, D.R. (2006). Food for Thought: Lower-Than-Expected Crop Yield Stimulation with Rising CO₂ Concentrations. *Science* *312*, 1918–1921.
- Lüthi, D., Le Floch, M., Bereiter, B., Blunier, T., Barnola, J.-M., Siegenthaler, U., Raynaud, D., Jouzel, J., Fischer, H., Kawamura, K., et al. (2008). High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature* *453*, 379–382.
- Markham, K.R., Ryan, K.G., Bloor, S.J., and Mitchell, K.A. (1998). An increase in the luteolin : Apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry* *48*, 791–794.
- Mathesius, U., Bayliss, C., Weinman, J.J., Schlaman, H.R.M., Spaink, H.P., Rolfe, B.G., McCully, M.E., and Djordjevic, M.A. (1998). Flavonoids Synthesized in Cortical Cells During Nodule Initiation Are Early Developmental Markers in White Clover. *MPMI* *11*, 1223–1232.
- Matteini, P., Agati, G., Pinelli, P., and Goti, A. (2011). Modes of complexation of rutin with the flavonoid reagent diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester. *Monatsh Chem* *142*, 885.

- McNally, J.G., Karpova, T., Cooper, J., and Conchello, J.A. (1999). Three-Dimensional Imaging by Deconvolution Microscopy. *Methods* 19, 373–385.
- Metelka, L., and Tolasz, R. (2009). Klimatické změny: fakta bez mýtů. Univerzita Karlova v Praze, Centrum pro otázky životního prostředí, Praha, ISBN 978-80-87076-13-2.
- Mikkelsen, B.L., Olsen, C.E., and Lyngkjaer, M.F. (2015). Accumulation of secondary metabolites in healthy and diseased barley, grown under future climate levels of CO₂, ozone and temperature. *Phytochemistry* 118, 162–173.
- Mondolot, L., La Fisca, P., Buatois, B., Talansier, E., De Kochko, A., and Campa, C. (2006). Evolution in Caffeoylquinic Acid Content and Histolocalization During *Coffea canephora* Leaf Development. *Ann Bot* 98, 33–40.
- Nezval, J., Stoch, M., Materova, Z., Spunda, V., and Kalina, J. (2017). Phenolic compounds and carotenoids during acclimation of spring barley and its mutant Chlorina f2 from high to low irradiance. *Biol. Plant.* 61, 73–84.
- Nicole, M., and Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, ISBN: 978-94-010-6568-9.
- Peer, W.A., Brown, D.E., Tague, B.W., Muday, G.K., Taiz, L., and Murphy, A.S. (2001). Flavonoid Accumulation Patterns of Transparent Testa Mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126, 536–548.
- Pérez-López, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., and Muñoz-Rueda, A. (2012). Elevated CO₂ reduces stomatal and metabolic limitations on photosynthesis caused by salinity in *Hordeum vulgare*. *Photosynth Res* 111, 269–283.
- Petit, J.R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N.I., Barnola, J.M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., et al. (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399, 429–436.
- Plášek, J. (2004). Víc než pouhý mikroskop. Vesmír, spol. s r.o., Praha, ISSN: 1214-4029, Vesmír 83, 586–588.
- Ramešová, Š., and Sokolová, R. (2014). Elektrochemická oxidace přírodních barviv používaných na uměleckých památkách. Česká společnost chemická, Praha, ISSN 1213-7103, Chemické listy 2014, 507–512.
- Reuber, S., Bornman, J.F., and Weissenböck, G. (1996). A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf. *Plant, Cell & Environment* 19, 593–601.
- Rollins, J.A., Habte, E., Templer, S.E., Colby, T., Schmidt, J., and von Korff, M. (2013). Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* 64, 3201–3212.
- Schmitz-Hoerner, R., and Weissenböck, G. (2003). Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry* 64, 243–255.
- Shahidi, F., and Naczki, M. (2003). Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press LLC, ISBN: 0-203-59485-1.

Sinclair, T.R., Pinter Jr, P.J., Kimball, B.A., Adamsen, F.J., LaMorte, R.L., Wall, G.W., Hunsaker, D.J., Adam, N., Brooks, T.J., Garcia, R.L., et al. (2000). Leaf nitrogen concentration of wheat subjected to elevated [CO₂] and either water or N deficits. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 79, 53–60.

Soukupová, J., Cvikrová, M., Albrechtová, J., Rock, B.N., and Eder, J. (2000). Histochemical and biochemical approaches to the study of phenolic compounds and peroxidases in needles of Norway spruce (*Picea abies*). *The New Phytologist* 146, 403–414.

Soukupová, J., Rock, B.N., and Albrechtová, J. (2001). Comparative study of two spruce species in a polluted mountainous region. *New Phytologist* 150, 133–145.

Tattini, M., Gravano, E., Pinelli, P., Mulinacci, N., and Romani, A. (2000). Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* 148, 69–77.

Teng, N., Jin, B., Wang, Q., Hao, H., Ceulemans, R., Kuang, T., and Lin, J. (2009). No Detectable Maternal Effects of Elevated CO₂ on *Arabidopsis thaliana* Over 15 Generations. *PLOS ONE* 4, e6035.

Urban, O. (2003). Physiological Impacts of Elevated CO₂ Concentration Ranging from Molecular to Whole Plant Responses. *Photosynthetica* 41, 9–20.

Wall, G.W., Garcia, R.L., Wechsung, F., and Kimball, B.A. (2011). Elevated atmospheric CO₂ and drought effects on leaf gas exchange properties of barley. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 144, 390–404.

Xu, Z., Shimizu, H., Yagasaki, Y., Ito, S., Zheng, Y., and Zhou, G. (2013). Interactive Effects of Elevated CO₂, Drought, and Warming on Plants. *J Plant Growth Regul* 32, 692–707.

Zhao, M., and Running, S.W. (2010). Drought-Induced Reduction in Global Terrestrial Net Primary Production from 2000 Through 2009. *Science* 329, 940–943.

Internetové zdroje

Share of main types of cereals, EU-28, 2015: Agriculture, forestry and fishery statistics. *Eurostat: Statistics Explained* [online]. [cit. 2017-08-21]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/images/6/6b/F2_Share_of_main_types_of_cereals_EU-28.PNG

Změna klimatu v ČR. *Český hydrometeorologický ústav (ČHMÚ): Historická data, počasí* [online]. [cit. 2017-08-20]. Dostupné z: http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/meteo/ok/klimazmena/files/cc_chap10.pdf

Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. *Earth System Research Laboratory (ESRL): Global Monitoring Division* [online]. [cit. 2017-08-20]. Dostupné z: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>

Introduction to Fluorescence. *Olympus Microscopy Resource Center* [online]. [cit. 2017-08-20]. Dostupné z: <http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/fluorointroduction.html>

Konfokální mikroskopie: Fluorochromy. *Katedra botaniky: Univerzita Palackého v Olomouci* [online]. [cit. 2017-08-20]. Dostupné z: <http://www.botanika.upol.cz/atlas/confmicro/fluorochroms.php>

Deconvolution: Image Processing for Widefield Microscopy. *Leica-microsystems: Science lab* [online]. [cit. 2017-08-20]. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/deconvolution/>

Cereals and Grains. *FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations* [online]. [cit. 2017-08-22]. Dostupné z: <http://www.fao.org/in-action/inpho/post-harvest-technologies/cereals-grains/en/>